

Aus dem Institut für Pathologie / Medizinische Fakultät der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler

Klinisch-pathologische Charakterisierung von Karzinomen der Gaumenmandel

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
der
Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Inci Bozkurt

aus Berlin

Rostock, 2017

urn:nbn:de:gbv:28-diss2018-0129-7

Gutachter:

Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler, Universität Rostock, Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Bernhard Frerich, Universität Rostock, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie

Prof. Dr. med. Wilko Weichert, Universität München, Institut für Pathologie

Jahr der Einreichung: 2017

Jahr der Verteidigung: 2018

VORWORT

1. In den letzten Jahrzehnten wurde in Bezug auf die oropharyngealen Tumore, insbesondere der Plattenepithelkarzinome, eine stetige Zunahme der Neuerkrankten beobachtet. Lokalisiert werden diese häufig in der Gaumenmandel. Oft werden Karzinome der Gaumenmandel erst im fortgeschrittenen Stadium festgestellt. Erstes klinisches Zeichen ist meist eine Lymphknotenmetastasierung im Hals-Bereich.
2. Bei oropharyngealen Karzinomen werden in der Literatur nach der Ursache zwei Tumortypen unterschieden: Nikotin-/Alkohol-assoziierte Tonsillenkarzinome und Karzinome, die durch Humane Papillomviren (HPV) begünstigt werden. Sie unterscheiden sich sowohl aus klinisch-pathologischer als auch aus prognostischer Sicht voneinander.
3. Auf biomolekularer Ebene weisen Nikotin-/Alkohol-assoziierte Tonsillenkarzinome häufig eine Mutation des Tumorsuppressorgens TP53 auf, welches zur Akkumulation des Proteins p53 führt. Im Gegensatz dazu wurde bei HPV-assoziierten Tonsillenkarzinomen eine Überexpression des Proteins p16^{INK4A} festgestellt.

THESEN

4. **Aufgabenstellung:** In der vorliegenden Arbeit wurden Tonsillenkarzinome retrospektiv immunhistochemisch untersucht. Um diese klinisch-pathologisch zu charakterisieren, wurden die immunhistochemischen Färbeargebnisse mit den klinisch-pathologischen Daten korreliert. Zudem wurde eine Überlebensanalyse durchgeführt. Ziel der Untersuchung war die Beantwortung der Frage, ob sich Tonsillenkarzinome in zwei unterschiedliche Tumortypen, d.h. in Nikotin-/Alkohol- und HPV-assoziierte Karzinome abgrenzen lassen. Die Gewebeproben stammten von Patienten, die in den Jahren 2000 bis 2013 in der Universitätsmedizin Rostock in Behandlung waren, und wurden vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt.
5. **Vorgehen:** Mit Hilfe der Tissue-Microarray-Technik wurden 169 Gewebeproben von Primärtumoren und 27 Gewebeproben von Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch gegen p16^{INK4A} und p53 gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Außerdem erfolgte bei Gewebeproben, die eine positive Färbung für beide Antikörper zeigten, eine HPV-Analyse. Darüber hinaus wurden die Färbeargebnisse der Primärtumore mit denen der Lymphknotenmetastasen verglichen. Abschließend erfolgten eine

statistische Korrelation der Färbeergergebnisse mit den klinisch-pathologischen Daten und eine Überlebensanalyse.

6. **Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung:** 98,2% (n=166) der Gewebeproben konnten lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Davon hatten 34% (n=56) eine positive Expression für Antikörper gegen p16 und 37% (n=62) wiesen eine p53-Positivität auf. Beim Vergleich der p16^{INK4A}- und p53-Färbeergergebnisse je Fall zeigte sich bei 8,4% (n=14) eine simultane Färbung für beide Antikörper.
7. **Simultane p16^{INK4A}- und p53-Positivität:** In 7 Fällen mit auswertbarer DNA, die eine simultane Färbung für beide Antikörper gezeigt hatten, wurde eine HPV-Analyse durchgeführt. Bei 5 Fällen lag HPV (Typ 16, 33) vor.
8. **Vergleich Primärtumor und Metastase:** Im Gegensatz zu den p53-Färbeergergebnissen zeigte sich beim Vergleich der p16^{INK4A}-Färbeergergebnisse für die Primärtumore und deren Lymphknotenmetastasen in allen Fällen eine identische Expression.
9. **Ergebnisse der Korrelationsanalyse:** Die Korrelationsanalyse ermittelte signifikante Ergebnisse in Bezug auf die Nikotinanamnese. Nichtraucher wiesen signifikant häufiger p16^{INK4A}-positive Karzinome auf (p<0,001). Im Gegensatz dazu wurden bei Rauchern signifikant häufiger p53-positive Tumore festgestellt (p=0,001). Im Vergleich zu den p16^{INK4A}-negativen Karzinomen waren p16^{INK4A}-positive Tonsillenkarzinome signifikant häufiger schlecht differenziert (p=0,021).
10. **Ergebnis der Überlebensanalyse:** Die Patientengruppe mit p16^{INK4A}-positiven Karzinomen wies einen signifikanten Überlebensvorteil jeweils im Vergleich zu den Patienten mit p16^{INK4A}-negativen und p53-positiven Karzinomen auf.
11. **Resümee:** In der vorliegenden Studie war im Gegensatz zur Literatur keine eindeutige Abgrenzung der Tonsillenkarzinome in zwei unterschiedliche Tumortypen möglich. Jedoch zeigte sich ein eindeutiger Überlebensvorteil für Patienten mit p16^{INK4A}-positiven Tonsillenkarzinomen. Demnach ist die immunhistochemische Färbung für Antikörper gegen p16^{INK4A} und p53 ein geeignetes Verfahren, um prognostische Aussagen zum Gesamtüberleben treffen zu können. Darüber hinaus ist der immunhistochemische Nachweis für Antikörper gegen p16^{INK4A} ein exzellentes Mittel, um bei einem „Cancer of Unknown Primary“ – (CUP)-Syndrom – die Lokalisation des Primärtumors einzugrenzen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	II-III
I. EINLEITUNG	1
1.1 EPIDEMIOLOGIE	1
1.2 ÄTIOLOGIE	1
1.3 KLINISCHE UND BILDGEBENDE DIAGNOSE	3
1.4 PATHOLOGISCHE DIAGNOSE	4
1.4.1 HISTOPATHOLOGISCHER DIFFERENZIERUNGSGRAD	4
1.4.2 HISTOPATHOLOGISCHE SUBTYPEN	4
1.4.3 TNM-KLASSIFIKATION	6
1.4.4 RESIDUALTUMOR-KLASSIFIKATION	8
1.4.5 FAKULTATIVE DESKRIPTOREN	8
1.5 THERAPIE	8
1.6 PROGNOSE	10
II. ZIELSETZUNG	11
III. MATERIAL UND METHODEN	12
3.1 ERSTELLUNG DER TUMORDATENBANK	12
3.2 TISSUE-MICROARRAY-TECHNIK	13
3.3 IMMUNHISTOCHEMISCHES VERFAHREN	15
3.4 BIOMOLEKULARES VERFAHREN	16
3.5 STATISTIK	17
IV. ERGEBNISSE	18
4.1 PATIENTENKOLLEKTIV	18
4.2 KLINISCH-PATHOLOGISCHE DATEN	18
4.2.1 LOKALISATION	18
4.2.2 HISTOPATHOLOGISCHER DIFFERENZIERUNGSGRAD	18

4.2.3	HISTOPATHOLOGISCHER SUBTYP	19
4.2.4	TNM-KLASSIFIKATION UND UICC-STADIENGRUPPIERUNG	20
4.2.5	RESIDUALTUMOR-KLASSIFIKATION	21
4.2.6	NIKOTIN- UND ALKOHOLANAMNESE	22
4.2.7	REZIDIV	23
4.3	AUSWERTUNG DER TMA	23
4.4	AUSWERTUNG DER P16 ^{INK4A} - UND P53 –FÄRBEERGEBNISSE	23
4.5	VERGLEICH DER P16 ^{INK4A} - UND P53-FÄRBEERGEBNISSE JE FALL	24
4.6	HPV-ANALYSE	27
4.7	FÄRBEERGEBNISSE: PRIMÄRTUMOR UND METASTASE	27
4.8	KORRELATIONSANALYSE	29
4.8.1	HISTOPATHOLOGISCHER DIFFERENZIERUNGSGRAD	29
4.8.2	HISTOPATHOLOGISCHER SUBTYP	30
4.8.3	NIKOTINANAMNESE	30
4.8.4	LYMPHKNOTENMETASTASEN-BEFUND	32
4.9	ÜBERLEBENSANALYSEN	33
4.9.1	UNIVARIATE ANALYSEN	33
4.9.2	MULTIVARIATE ANALYSEN	34
V.	DISKUSSION	36
5.1	DIE ROLLE DES P16 ^{INK4A} UND P53	37
5.2	METHODIK-DISKUSSION	38
5.3	ERGEBNIS-DISKUSSION	39
5.3.1	GRÜNDE FÜR DIE GERINGEREN EXPRESSIONSRATEN IM VERGLEICH ZUR LITERATUR	40
5.3.2	ABHÄNGIGKEIT DER EXPRESSION VON RISIKOFAKTOREN	44
5.3.3	SIMULTANE P16 ^{INK4A} - UND P53-POSITIVITÄT	44
5.3.4	PRIMÄRTUMOR UND LYMPHKNOTENMETASTASE	45

5.3.5	KLINISCH-PATHOLOGISCHE PARAMETER	46
5.3.6	TUMORTYPEN.....	47
5.3.7	KLINISCH-PATHOLOGISCHE UNTERSCHIEDE	48
5.3.7.1	TNM- UND UICC-STADIEN	48
5.3.7.2	DIFFERENZIERUNGSGRAD UND SUBTYP	49
5.3.7.3	NIKOTINANAMNESE	49
5.3.8	PROGNOSTISCHE UNTERSCHIEDE	50
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	52
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	54
VII.	DANKSAGUNG.....	65
VIII.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	66
IX.	CURRICULUM VITAE	67

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

cTNM	chirurgischer Befund der Tumorausdehnung, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen
CUP	Cancer of Unknown Primary
DAB	Diaminobenzin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ExpR	Expressionsrate
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPV	Humanes Papillomvirus
IHC	Immunhistochemie
Ca	Karzinom
OPSCC	Plattenepithelkarzinom des Oropharynx
OS	Gesamtüberleben
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEC	Plattenepithelkarzinom
PFS	progressionsfreies Überleben
pM	pathologischer Fernmetastasen-Befund
pN	pathologischer Lymphknotenmetastasen-Befund
pT	pathologischer Befund der Tumorausdehnung
pV, pL, pPn	pathologischer Befund der Invasion in Venen (V), Lymphgefäße (L), Perineuralscheide (Pn)
Rb-Protein	Retinoblastomprotein
Rb-E2F-Komplex	Retinoblastom-E2F-Komplex
TCa	Tonsillenkarzinom = Plattenepithelkarzinom der Tonsilla palatina
TMA	Tissue Microarray
UICC-Klassifikation	Gruppierung der Karzinome bezüglich der TNM-Kategorien der Union internationale contre le cancer
WHO	World Health Organization

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1 A: Darstellung des Tissue-Microarray-Verfahrens	13
Abb. 1 B: Konstruktionsplan des TMA.....	14
Abb. 2: Bild der hergestellten TMA-Blöcke	15
Abb.3: Mikroskopisches Bild der histopathologischen Differenzierungsgrade	19
Abb. 4 A, B: Kreisdiagramme der Nikotin- und Alkoholanamnese	22
Abb. 5 A, B: Kreisdiagramme der p16 ^{INK4A} - und p53-Färbeergebnisse	24
Abb. 6: Kreisdiagramm der p16 ^{INK4A} - und p53-Färbungeergebnisse je Fall	25
Abb. 7 A, B: Mikroskopische Bilder der simultanen Expression für p16 ^{INK4A} und p53	25
Abb. 8 A, B: Mikroskopische Bilder der p16 ^{INK4A} -Positivität und p53-Negativität	26
Abb. 9 A, B: Mikroskopische Bilder der p53-Positivität und p16 ^{INK4A} -Negativität	26
Abb. 10 A, B: Mikroskopische Bilder der p53- und p16 ^{INK4A} -Negativität	26
Abb. 11: Säulendiagramm: Vergleich der Färbeergebnisse der Primärtumore und Metastasen	28
Abb. 12 A, B: mikroskopisches Bild der p16 ^{INK4A} -Positivität des Primärtumors und der Metastase	28
Abb. 13 A, B: Säulendiagramm: Korrelation Differenzierungsgrad / p16 ^{INK4A} - und p53-Expression	29
Abb. 14 A, B: Kreisdiagramm: Korrelation Nikotinanamnese / p16 ^{INK4A} -Expression	31
Abb. 15 A, B: Kreisdiagramm: Korrelation Nikotinanamnese / p53-Expression	31
Abb. 16 A, B: Kaplan-Meier-Überlebenskurve: p16 ^{INK4A} - und p53-Expression.....	34
Abb. 17 A: Kaplan-Meier-Überlebenskurve: p16 ^{INK4A} -/p53-Expressionsprofil.....	34
Abb. 17 B: Kaplan-Meier-Überlebenskurve: Nikotinanamnese.....	34
Tab. 1: Histopathologisches Grading der Oropharynxkarzinome	4
Tab. 2: Seltene histopathologische Subtypen der oropharyngealen Karzinome	5
Tab. 3: T-Kategorien der Oropharynxkarzinome	6
Tab. 4: N-Kategorien der Oropharynxkarzinome	7
Tab. 5: M-Kategorien der Oropharynxkarzinome	7

Tab. 6: UICC-Stadiengruppierung der Kopf-Hals-Tumore.....	7
Tab. 7: Residualtumor-Klassifikation	8
Tab. 8: Fakultative Deskriptoren.....	8
Tab. 9: Therapiemaßnahmen in Abhängigkeit von der TNM-Klassifikation	9
Tab. 10: Klinisch-pathologische Daten.....	12
Tab. 11: Anzahl der Stenzen je Gewebeprobe und Art des entnommenen Gewebes	14
Tab. 12: Verwendete Antikörperklone und Färbevorgang	16
Tab. 13: Lichtmikroskopische Bewertungskriterien der p16 ^{INK4} - und p53-Färbung	16
Tab. 14: Verteilung der Differenzierungsgrade und der Subtypen.....	20
Tab. 15: Verteilung der TNM-Kategorien und der UICC-Stadien.....	21
Tab. 16: Verteilung der Residualtumore.....	22
Tab. 17: Rezidivrate.....	23
Tab. 18: Verteilung der p16 ^{INK4A} - und p53-Färbeergebnisse.....	24
Tab. 19: Ergebnisse der HPV-Analyse.....	27
Tab. 20: Korrelation: Differenzierungsgrade / p16 ^{INK4A} - und p53-Färbeergebnisse	29
Tab. 21: Korrelation: Subtypen / p16 ^{INK4A} - und p53-Färbeergebnisse	30
Tab. 22: Korrelation: Nikotinanamnese / p16 ^{INK4A} -Färbung	31
Tab. 23: Korrelation: Nikotinanamnese / p53-Färbung	31
Tab. 24: Korrelation: Lymphknotenmetastasen-Befund / p16 ^{INK4A} - und p53-Färbeergebnisse.....	32
Tab. 25: p-Werte der statistischen Analyse.....	32
Tab. 26: Uni- und multivariate Analyse des Gesamtüberlebens	35
Tab. 27: Uni- und multivariate Analyse des progressionsfreien Überlebens	35
Tab. 28: Literaturübersicht: p16 ^{INK4A} - und p53-Expressionsraten	42 - 43
Tab. 29: Literaturübersicht: HPV-Status / p16 ^{INK4A} - und p53-Expressionsraten	45
Tab. 30: Unterteilung der oropharyngealen Karzinome in zwei Tumortypen	48

I. EINLEITUNG

1.1 EPIDEMIOLOGIE

In den letzten Jahrzehnten wurde in Bezug auf die oropharyngealen Tumore, insbesondere der Plattenepithelkarzinome, eine stetige Zunahme der Neuerkrankten beobachtet.^{1,2} Lokalisiert werden diese Karzinome häufig in der Gaumenmandel.^{1,3,4} Karzinome im Kopf-Hals-Bereich stehen bezüglich der Häufigkeit aller Krebserkrankungen an sechster Stelle.^{1,5,6} Weltweit erkranken jedes Jahr über eine halbe Millionen Menschen an einem Kopf-Hals-Tumor.^{1,7} Mit jährlich 500.000 Neuerkrankungen und 271.000 Todesfällen liegt die globale Sterberate bei 50%.^{8,1,9} Nach aktuellen Angaben des Robert Koch-Instituts wurde im Jahr 2010 in Deutschland bei 9.340 Männern und 3.490 Frauen ein Mundhöhlen- und Rachentumor diagnostiziert.¹⁰ Zugleich wurde festgestellt, dass die Zahl der Erkrankungen bei Männern stagniert.¹⁰ Laut standardisierter Sterberate starben im Jahr 2010 in Deutschland 7,2 Männer und 1,8 Frauen bezogen auf 100.000 Personen an den Folgen von Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens.¹⁰ Innerhalb Deutschlands wurden die höchsten Erkrankungs- und Sterberaten bei Frauen in Hamburg und Bremen und bei Männern in Mecklenburg-Vorpommern ermittelt.¹⁰ Im internationalen Vergleich ergeben sich für Männer in Frankreich und für Frauen in Dänemark die höchsten Erkrankungsraten.¹⁰ Bezogen auf die Tumorerkrankungen im gesamten Kopf-Hals-Bereich lag die relative Überlebensrate zwischen 2009 und 2010 in Deutschland für Männer bei 48% und für Frauen bei 61%.¹⁰

1.2 ÄTIOLOGIE

Wie in vielen Studien ausführlich beschrieben, ist die Entstehung von Krebserkrankungen durch einen multifaktoriellen Prozess gekennzeichnet.^{11,12} Die signifikanten ätiologischen Faktoren sind: Tabakkonsum und übermäßiger Konsum von Alkohol.^{13,14} Aber auch der Betelnusskonsum, der in asiatischen Ländern sehr verbreitet ist, gilt als ein relevanter Risikofaktor.^{15,16} Darüber hinaus begünstigen ein schwaches Immunsystem, eine einseitige, vitaminarme Ernährung, eine schlechte Mundhygiene sowie die mechanische Reizung der Mundschleimhaut, z. B. durch schlecht sitzende Prothesen die Entstehung eines Karzinoms im Kopf-Hals-Bereich.^{10,11,16} Eine Infektion mit dem Humanen Papillomvirus (HPV), insbesondere der Tonsilla palatina, ist ebenfalls mit oropharyngealen Karzinomen assoziiert.^{17,16} Einige Studien weisen darauf hin, dass eine orale HPV-Infektion vom Sexualverhalten und der Anzahl von Sexualpartnern abhängt.^{9,18–20} Die Patientengruppe, bei der dies beobachtet wurde, konsumierte weder Nikotin noch Alkohol und war jünger als die Patientengruppe mit Nikotin-/Alkohol-assoziierten

Tumoren.^{21,22} Jedoch ist auch nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft die Ursache für die Entwicklung von HPV-assoziierten Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich noch nicht eindeutig geklärt.^{23,24}

Eine Vielzahl von Studien belegen, dass die oropharyngealen Ca bzw. die Tonsillenkzinome (TCa) in Nikotin-/Alkohol-assoziierte TCa und HPV-assoziierte TCa unterteilt werden können.^{6,20,25,26} Beide Tumortypen weisen unterschiedliche Pathogenesewege auf.^{27,28}

Auf biomolekularer Ebene betrachtet, treten Mutationen des TP53 verstärkt bei Patienten mit einer positiven Nikotin- und Alkoholanamnese auf.^{25,20} TP53 ist ein bekanntes Tumorsuppressorgen.²⁹ Das Genprodukt p53 hat im Zellzyklus die Aufgabe, DNA-Schäden zu beheben und unter Umständen die Apoptose einzuleiten.²⁹ Die gestörte Funktion des Proteins p53 lässt die Replikation und Zelldifferenzierung von abnormalen Zellen zu.³⁰ Durch ihre Akkumulation in der Zelle bilden sich maligne Neoplasien.³⁰ Eine Störung des p53-Signalweges durch Genmutation, Proteininaktivierung oder andere negative Modifikationen lässt sich in mehr als 50% der Fälle bei Plattenepithelkarzinomen (PEC) im Kopf-Hals-Bereich feststellen.³⁰ Dagegen tritt eine Überexpression des Proteins p16^{INK4A} bei HPV-assoziierten Ca auf.^{9,2,31}

HPV umfasst mehr als 100 Subtypen, diese werden in „high-risk“ und „low-risk“ Typen unterteilt.^{6,32} 90% der HPV-positiven oropharyngealen Karzinome werden durch den HPV „high-risk“ Typ 16 verursacht.^{22,33} Damit sich die HPV replizieren und eine Zelle infizieren können, müssen sie in Kontakt mit den teilungsfähigen Basalzellen des Epithels kommen.²⁶ Das lymphatische Gewebe der Tonsille sowie die Oropharynx- und Mundschleimhaut sind durch ein mehrschichtiges Plattenepithel begrenzt.²⁶ Jedoch werden die Krypten der Gaumenmandel von einem teilweise einschichtigen Epithel ausgekleidet, das der Basalzellschicht entspricht.²⁶ Man vermutet, dass die Viren dadurch einen erleichterten Zugang zu den Basalzellen haben und diese infizieren können.^{26,19,5} Die virale Infektion ist ein früher Prozess, den die viralen Onkoproteine E1 und E2 veranlassen.²⁶ Das virale Onkoprotein E5 fördert die Proliferation, indem es unterschiedliche Wachstumsfaktor-Rezeptoren stabilisiert.²⁶ Eine Schlüsselrolle bei HPV-assoziierten Ca haben die viralen Onkoproteine E6 und E7.^{34,35,26,22} Diese werden überwiegend in den suprabasalen Zellen gebildet.^{26,6} Sie greifen in die Regulation des Zellzyklus ein, indem sie an Hauptregulatorproteine binden und deren Funktion direkt oder indirekt beeinflussen.^{36,37} Dies führt zur Immortalisierung und malignen Transformation der Wirtszelle.^{26,35} Das Protein p16^{INK4A} ist ein Cyklin-abhängiger Kinase-4-Inhibitor, der die im G1-Zyklus vorkommenden Cyklin-abhängigen Kinasen, Cdk4 und Cdk6 hemmt und somit eine negative Wirkung auf die Zellproliferation hat.^{38,39,28,37} Das p16^{INK4A}-Protein unterliegt einem negativen Feedback-Mechanismus.^{40,41} Eine Überexpression entsteht, da der negative Feedback-Mechanismus durch die viralen Onkoproteine gehemmt wird.^{40,42} Dies führt dazu, dass es in der Zelle zu einer hohen Konzentration von p16^{INK4A} kommt, welches aber funktionell inaktiv ist.^{26,42} Anhand von

immunhistochemischen Verfahren können diese Mechanismen, das heißt, die Akkumulation des mutierten p53-Proteins und die Überexpression des p16-Proteins, durch spezifische Antikörper erfasst werden.^{26,22}

1.3 KLINISCHE UND BILDGEBENDE DIAGNOSE

Im Gegensatz zu den Mundhöhlenkarzinomen verlaufen die frühen Stadien der oropharyngealen Karzinome oftmals symptomlos und sind durch eine visuelle Kontrolle kaum zu erfassen.^{43,44,18} Dies hat zur Folge, dass die Mehrheit der oropharyngealen Tumore erst in einem späten Stadium diagnostiziert wird.^{15,18} Häufig wird als erstes Zeichen eines TCa eine Lymphknotenmetastasierung im Halsbereich festgestellt.^{18,31} Typisch für die Lymphknotenmetastasen ist ihre zystische Gestalt.^{45,18} Als weitere Symptome kommen Halsschmerzen und Schluckbeschwerden hinzu.^{15,43} Da evaluierte Screening-Untersuchungen für Kopf-Hals-Tumore noch nicht die Regel sind, ist besonders der behandelnde Zahnarzt angewiesen, im Rahmen der zweimal jährlich empfohlenen systematischen Untersuchung der Mundhöhle und des Rachens auf derartige Hinweise zu achten.^{46,47}

Als verdächtig gilt jede Läsion, die sich nach einer Beobachtung und Therapie von zwei Wochen nicht zurückbildet und sich nicht eindeutig einer definierten Grunderkrankung oder Ursache zuordnen lässt.^{44,48} Besonders bei Personen mit einem bestimmten Risikoprofil, wie z. B. höherem Alter und einer positiven Nikotin- und Alkoholanamnese sollten regelmäßige Kontrollen erfolgen.^{44,46} Bei Verdacht auf eine potenziell maligne Läsion sollte eine Probebiopsie erfolgen.⁴⁴ Bestätigt sich der Verdacht histologisch, wird anschließend eine Panendoskopie durchgeführt, um auch die nicht einsehbaren Bereiche wie den Hals- und Rachenraum auf mögliche kanzerogene Prozesse zu kontrollieren.⁴⁴ Bei visuell diagnostizierten ulzerativen Prozessen sind bildgebende Methoden (Magnetresonanztomografie, Computertomografie) das Mittel der Wahl, um die Ausdehnung des Karzinoms sowie Sekundärkarzinome und Fernmetastasen auszuschließen.^{47,15} Falls kein Primärtumor feststellbar ist, jedoch Lymphknotenverhärtungen im Halsbereich ertastet werden, wird zuerst sonografiert, um mögliche Metastasen zu diagnostizieren.⁴⁷ Bei der anschließenden pathologischen Diagnostik werden standardisierte immunhistochemische Verfahren angewandt.^{49,50,21}

1.4 PATHOLOGISCHE DIAGNOSE

1.4.1 HISTOPATHOLOGISCHER DIFFERENZIERUNGSGRAD

Plattenepithelkarzinome (PEC) sind die häufigsten malignen Tumore des Oropharynx.^{51,52} Das Grading dient der histopathologischen Beschreibung des Differenzierungsgrades der Karzinome.⁵³ Es gibt an, wie sehr sich die entarteten Zellen von den Zellen des Ausgangsgewebes unterscheiden.⁵³ Die Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterscheidet zwischen gut (G1), mäßig (G2), schlecht/wenig (G3) und undifferenzierten (G4) PEC (Tab. 1).⁵³

Grad	Histopathologisches Grading
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

Tab. 1: Histopathologisches Grading der Oropharynxkarzinome⁵³

1.4.2 HISTOPATHOLOGISCHE SUBTYPEN

Invasive PEC bestehen aus atypischen epithelialen Tumorzellformationen, die in das subepitheliale Stroma infiltrierend und destruierend einwachsen.¹⁸ Die Zellen neigen zur Verhornung und je nach Differenzierungsgrad bilden sich sogenannte Hornperlen aus, die vor allem bei gut differenzierten PEC zu finden sind.¹⁸ Des Weiteren sind die Kernpleomorphie, die Häufigkeit von atypischen Mitosen oder die Kernhyperchromasie typische Charakteristika der Tumorzellen.^{18,44} In der Tumorumgebung findet sich häufig ein gemischtzelliges Entzündungsinfiltrat.⁴⁴ Der größte Teil der PEC präsentiert sich makroskopisch als exophytische, ulzerative oder kombinierte Läsion.¹⁸ Exophytische Läsionen sind seltener und weniger infiltrativ wachsend als ulzerative Läsionen.¹⁸ „Low grade“ Tumore sind stärker verhornt, haben seltener atypische Mitosen und sind besser differenziert.¹⁸ Die PEC werden laut der WHO in verruköse, basaloide, papilläre, spindellzellartige, akantolytische, adenosquamöse und lymphoepitheliale Subtypen unterteilt.⁵³

Verruköses Karzinom: Dieses ist ein gut differenziertes, zunächst exophytisch, später auch endophytisch wachsendes Ca.⁵³ Klinisch sind leukoplakische und erythroplakische Veränderungen der Mundschleimhaut zu erkennen.⁵³ Es wächst langsam, jedoch infiltrativ und kann bei Fortschreiten

umliegende Strukturen destruieren.⁵¹ Das verruköse Ca metastasiert erst im späteren Verlauf.⁵³ Histologisch befinden sich an der oberflächlichen Schicht verhornende Areale.⁵¹ Große Tumorzellen sind in der basalen Schicht in Verbänden angeordnet.⁵¹ Es gibt geringe Zellatypien und die Mitoserate ist unauffällig.^{51,53} Die fokale Dysplasie und Atypien sind auf die basale Schicht begrenzt.^{51,53} Das verruköse Karzinom ist schwer zu diagnostizieren, da die Läsion auf den ersten Blick zytologisch nicht als maligne zu erkennen ist.⁵¹ Daher ist eine sichere Diagnose an oberflächlichen Biopsien oft nicht möglich.⁵³

Basaloides Karzinom: Das basaloide Ca weist makroskopisch eine exophytische, knotige Gestalt mit zentraler Nekrose auf.⁵¹ Es handelt sich um einen aggressiv wachsenden, gering differenzierten und histologisch deutlich zu erkennenden Subtyp.⁵² Dieser Tumor hat den Trend, submukös zu wachsen und eine zentrale Ulzeration aufzuweisen.⁵² Er besteht aus pleomorphen, basaloiden Zellen, die nestartige Verbände bilden.⁵² Das basaloide Ca ist ein zweiphasiges PEC mit basaloiden und verhornenden Elementen.⁵² In der Literatur wird berichtet, dass HPV-assoziierte PEC vermehrt eine basaloide Form aufweisen.⁵² Ein Metastasierungsrisiko besteht bei zwei Dritteln der Tumore.⁵³

Lymphoepitheliales Karzinom: Das lymphoepitheliale Ca ist ein seltenes, undifferenziertes Ca mit prominenten reaktiven lymphoplasmatischen Infiltraten.⁵² Es zeichnet sich durch ein aggressives Wachstum aus und neigt zu Lymphknoten- und Fernmetastasen.⁵² Dieser Subtyp ist häufig mit dem Epstein-Barr-Virus assoziiert.⁵³ Die seltenen histopathologischen Subtypen der oropharyngealen Karzinome sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 2).

Subtyp	Histologie
Lymphoepitheliales Karzinom⁵³	undifferenziertes Ca, aggressives Wachstum, prominente reaktive lymphoplasmatische Infiltrate, mit Epstein-Barr-Virus assoziiert
papilläres Karzinom^{52,51}	oberflächliche Invasion ohne Perineuralscheiden-, Gefäß- und Knocheninfiltration, vergrößerte Zellkerne mit prominenten Nukleoli, kaum Zytoplasma, geringe oberflächliche Verhornung, atypische Mitosen, Zellatypien, rezidiv-freudig, Lymphknotenmetastasierung
spindelzelliges Karzinom^{51,18}	morphologisch als zweiphasiger Tumor mit epithelialen und spindelzellförmigen Komponenten, gut differenziert, oberflächliche Hornperlen in Nestern angeordnet, mäßiger Kernpleomorphismus, erhöhte Mitoserate, spindelförmige Zellen, schnelles, aggressives Wachstum
akantholytisches Karzinom⁵²	inselförmig angeordnete verhornende Epithelzellen im Stratum spinosum, pseudoglanduläre Gestalt der Zellen, Auflösung der Interzellularbrücken (Spaltbildung zwischen den Zellen)
adenosquamöses Karzinom⁵¹	gut und schlecht differenzierte Bereiche, Hornperlenformationen, ausgeprägte Interzellularbrücken, atypische Mitosen, pleomorphe Zellgestalt, Dyskeratosen, häufig Perineuralscheideninvasionen, starke Lymphknotenmetastasierung

Tab. 2: Aufgeführt sind die seltenen histopathologischen Subtypen der oropharyngealen Karzinome.^{54,52}

1.4.3 TNM-KLASSIFIKATION

Das TNM-System zur Beschreibung der anatomischen Ausbreitung von Tumoren beruht auf der Charakterisierung von drei Komponenten⁵⁴: die Ausbreitung des Primärtumors (T), die Ausbreitung in regionären Lymphknoten (N) und das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen (M) (Tab. 3,4,5).^{15,54} Durch das Hinzufügen von Ziffern wird die Ausbreitung der malignen Erkrankung angezeigt⁵⁴: T0, T1, T2, T3, T4; N0, N1, N2, N3; M0, M1.

Die postoperative pathologische Klassifikation (pTNM) wird für die Indikation der fortführenden Therapie verwendet und liefert zusätzliche Daten, um die Prognose abzuschätzen.⁵⁴

Nach der Festlegung der TNM-Kategorien können diese zu UICC-Stadien gruppiert werden (Tab. 6).^{54,15} Durch die Zuordnung des Tumors zu einem bestimmten Stadium (Staging) lassen sich prognostisch homogene Patientengruppen bilden.⁵⁴ Patienten einer Gruppe weisen bezüglich ihrer Überlebensraten üblicherweise ähnliche Werte auf.⁵⁴ Das klinische Stadium ist entscheidend für die Behandlungsplanung und Prognosebeurteilung und erleichtert den interdisziplinären Informationsaustausch.⁵⁴

T-Kategorien	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größerer Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größerer Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größerer Ausdehnung
T4a	Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus, M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

Tab. 3: T-Kategorien der Oropharynxkarzinome; beziehen sich auf die Ausdehnung des Tumors.^{54,15}

N-Kategorien	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger großer Ausdehnung Metastase(n) wie nachfolgend beschrieben: N2a Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung N2b Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2	N2c Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung

 Tab. 4: N-Kategorien der Oropharynxkarzinome^{54,15}

M-Kategorien	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

 Tab. 5: M-Kategorien für Oropharynxkarzinome^{54,15}

Stadium	TNM-Klassifikation		
	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1,T2 T3	N1 N0, N1	M0 M0
Stadium IVa	T1, T2, T3 T4a	N2 N0,N1,N2	M0 M0
Stadium IVb	T4b jedes T	jedes N N3	M0 M0
Stadium IVc	jedes T	jedes N	M1

 Tab. 6: UICC-Stadiengruppierung der Kopf-Hals-Tumore^{54,15}

1.4.4 RESIDUALTUMOR-KLASSIFIKATION

Das Fehlen oder Vorhandensein eines Residualtumors nach einer chirurgischen Behandlung wird durch die R-Klassifikation beschrieben (Tab. 7).⁵⁴ Sie spiegelt die Effekte der Operation wider und beeinflusst das weitere therapeutische Vorgehen.⁵⁴

R-Klassifikation	Residualtumor
RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	kein Residualtumor
R1	mikroskopischer Residualtumor
R2	makroskopischer Residualtumor

Tab. 7: Residualtumor-Klassifikation⁵⁴

1.4.5 FAKULTATIVE DESKRIPTOREN

Diese Zusatzklassifikationen geben Aufschluss über die Invasion des Tumors in die Venen (V), die Lymphgefäße (L) und Perineuralscheiden (Pn) (Tab. 8).⁵⁴ Sie gelten als zusätzliche Parameter bei der Therapieentscheidung.⁵⁴

Veneninvasion (V)	Lymphgefäßinvasion (L)	Perineurale Invasion (Pn)
V0 = keine	L0 = keine	Pn0 = keine
V1 = mikroskopisch	L1 = Invasion vorhanden	Pn1 = Invasion vorhanden
V2 = makroskopisch	-	-

Tab. 8: Fakultative Deskriptoren der Kopf-Hals-Tumore⁵⁴

1.5 THERAPIE

Um die Therapie planen zu können und mögliche Komplikationen und Risiken abzuwägen, muss bei der Krankengeschichte des Patienten erfasst werden und die soziale und die Familienanamnese erfolgen.¹⁸ Ein weiterer essenzieller Faktor bei der Behandlung von Kopf-Hals-Karzinomen ist die interdisziplinäre Abstimmung innerhalb von Tumorboards unter Beteiligung der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Strahlentherapie, Onkologie, Pathologie und Radiologie.^{47,15} Zu den Therapiemöglichkeiten gehören die chirurgische Entfernung des Tumors, Radiotherapie und Chemotherapie.⁵⁵ Die therapeutischen Maßnahmen für PEC mit HPV unterscheiden sich bislang nicht von denjenigen für HPV-negative PEC.^{56,34} Jedoch zeigen Studien, dass ein positiver HPV-Status mit in die Behandlungsentscheidung einbezogen werden sollte, da HPV-assoziierte Ca sensibler auf eine

Radiotherapie reagieren.^{22,57} Entscheidend für die Wahl der jeweiligen Behandlung sind die TNM-Klassifikation, der Status der Resektionsränder und die Lokalisation des Primärtumors; in manchen Fällen auch der histopathologische Differenzierungsgrad, die Tumordicke, Perineuralscheideninvasion, Lymphgefäßinvasion sowie Veneninvasion.^{58,59} Individuelle Faktoren wie Vorerkrankungen, Alter und Patientenpräferenzen müssen ebenfalls berücksichtigt werden.³⁴

Bei geringer Tumorausbreitung (T1, T2) wird die chirurgische Therapie oder die Radiotherapie angewandt (Tab. 9).^{60,15,61} Bei Patienten mit fortgeschrittenem, nicht operablem Mundhöhlenkarzinom soll besonders in den Altersgruppen bis 70 Jahre eine primäre Radiochemotherapie einer alleinigen Radiotherapie vorgezogen werden.^{47,61} Eine postoperative Radio- oder Radiochemotherapie wird bei fortgeschrittenen T-Kategorien (T3/T4), knappen oder positiven Resektionsrändern, perineuraler Invasion, Gefäßinvasion und Lymphknotenbefall eingesetzt (Tab. 9).^{15,61} Laut den Literaturangaben weisen 15-30% der Patienten mit einem negativen Lymphknotenmetastasen-Befund (N0-Kategorie) häufiger okkulte Metastasen auf.^{47,60,61} Damit das Risiko für ein Rezidiv gering bleibt, wird bei diesen Patienten eine prophylaktische Lymphknotenausräumung oder eine Radiotherapie durchgeführt (Tab. 9).^{47,15,60}

Insbesondere für TCa gibt es zu wenige Studien, die über eine geeignete Therapie berichten.⁶⁰ Das aggressive, regionale und sehr oft nicht diagnostizierbare Wachstum von TCa kommt erschwerend hinzu.⁶⁰ Auch hier wird eine multimodale Therapie empfohlen.⁶⁰ Abschließend sollte ein Nachsorgeplan erstellt werden.¹⁵ Dieser beinhaltet unter anderem kaufunktionelle Rehabilitation, Sprech- und Schluckrehabilitation, psychosoziale Beratung und Betreuung.¹⁵ Außerdem sollten die Patienten in ein Recall-Programm aufgenommen werden, damit ein erneutes Auftreten des Karzinoms frühzeitig erkannt wird.¹⁵ Nach dem fünften Jahr ohne Rezidiv kommen die üblichen Früherkennungsmaßnahmen zur Anwendung.¹⁵ Die nachfolgende Tabelle veranschaulicht die Therapiemaßnahmen in Abhängigkeit von der TNM-Klassifikation (Tab. 9).

T-Kategorien	N-Kategorien	Chirurgische Therapie	Neck-Dissection	Radiotherapie
Tis	N0	ja	nein	nein
T1	N0	nein	nein	ja, inklusive Halslymphknoten
T1,T2	N0	ja	SND	nein
T1,T2	N0	nein	nein	ja, inklusive Halslymphknoten
T2-T4	N1-N3	ja	MRND, RND	ja, postoperativ primäre Radiochemotherapie
T3,T4	N1-N3	inoperabel	nein	

Tab. 9: Therapiemaßnahmen in Abhängigkeit von der TNM-Klassifikation (Abkürzungen: SND – selektive Neck-Dissection, MRND – modifizierte radikale Neck-Dissection, RND – radikale Neck-Dissection)⁶¹

1.6 PROGNOSE

Die Prognose von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren ist von klinischen und histopathologischen Faktoren abhängig.⁵⁹ Sie richtet sich nach dem Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, der Lokalisation, den Resektionsrändern nach chirurgischer Entfernung, der Metastasierung, perivaskulärer Invasion und perineuraler Invasion.⁵⁹ Des Weiteren kann auch der histopathologische Subtyp bedeutsam sein; z.B. haben adenosquamöse und basaloide Karzinome eine höhere Metastasierungsneigung als verruköse Ca und demzufolge eine schlechtere Prognose.⁶² Ein entscheidende Faktor bei TCa ist der Lymphknotenmetastasen-Befund.^{62,63} Die 5-Jahres-Überlebensrate bei TCa beträgt im Durchschnitt etwa 25-60%. Im Stadium I liegt sie bei etwa 65-93%, im Stadium II bei 40-80%, im Stadium III bei 30-50% und im Stadium IV bei 3-35%.⁶⁴ Viele Studien belegen, dass sich HPV-assoziierte oropharyngeale Karzinome hinsichtlich des Verlaufs, der Überlebensrate und weiteren klinisch-pathologischen Parametern von den nicht HPV-assoziierten Ca unterscheiden.^{20,26,55,6} Darüber hinaus haben Patienten mit HPV-positiven Karzinomen eine besser Prognose als Patienten mit HPV-negativen Ca.^{26,55,22,25}

II. ZIELSETZUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Tonsillenkarcinome retrospektiv immunhistochemisch untersucht. Die Gewebeproben stammten von Patienten, die in den Jahren 2000 bis 2013 in der Universitätsmedizin Rostock in Behandlung waren, und wurden vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt.

Um diese klinisch-pathologisch zu charakterisieren, wurden die immunhistochemischen Färbeargebnisse mit den klinisch-pathologischen Daten korreliert. Zudem wurde eine Überlebensanalyse durchgeführt.

Die Untersuchung verfolgte die Fragestellung, ob sich beim TCa zwei Tumortypen, d.h. Nikotin-/Alkohol- und HPV-assoziierte Karzinome abgrenzen lassen, die sich auf klinisch-pathologischer und prognostischer Ebene voneinander unterscheiden.

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 ERSTELLUNG DER TUMORDATENBANK

Aus der Datenbank des Instituts für Pathologie der Universität Rostock konnten mit der pathologischen Software „Pathix Rev“ Patientenfälle der Jahre 2000 (Januar) bis 2013 (September) erfasst werden, bei denen Karzinome der Gaumenmandel als Primärtumor diagnostiziert worden waren.

Datentyp	Patientendaten
Patientendaten	Name, Alter, Geschlecht, Alkohol- und Nikotinanamnese
klinische Daten	Diagnosedatum, Lokalisation, Sterbedatum, cTNM-Klassifikation, Therapieart, Datum der Rezidiv- und Progressionsdiagnose
histopathologische Daten	Eingangsdatum, Identifikationsnummer, Differenzierungsgrad, Stadieneinteilung, pTNM-Klassifikation, Subtyp

Tab. 10: Aufgeführt sind die Daten, die zur Erstellung der Tumordatenbank für Tonsillenkarzinome verwendet wurden. (Abkürzungen: cTNM - chirurgischer Befund Tumorgöße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen-Befund, pTNM - pathologischer Befund Tumorgöße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen-Befund).

Die histopathologischen Daten und die klinischen Daten wurden aus der internen Befunddatenbank des Institutes für Pathologie (Pathix) entnommen (Tab. 10). Einige klinische Daten wie das Sterbedatum, die cTNM-Klassifikation, die Therapieart, das Datum der Rezidiv- und Progressionsdiagnose stammten aus dem Krebsregister Rostock. Anhand dieser Daten konnte das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) ermittelt werden. Die Angaben zur Alkohol- und Nikotinanamnese des Patientenkollektivs konnten durch Einsicht in die Krankenakten aus der Otto-Körner-HNO-Klinik der Universität Rostock größtenteils komplettiert werden. Die Patientendaten wurden mittels Excel-Programm Windows 2013 verarbeitet und gemäß der allgemeinen Datenschutzrichtlinie anonymisiert.

3.2 TISSUE-MICROARRAY-TECHNIK

Die von Kononen et al. entwickelte Tissue-Microarray(TMA)-Technik ist eine zeit- und kostengünstige Methode, mit der Hunderte von Gewebeproben simultan untersucht werden können (Abb. 1A).⁶⁵

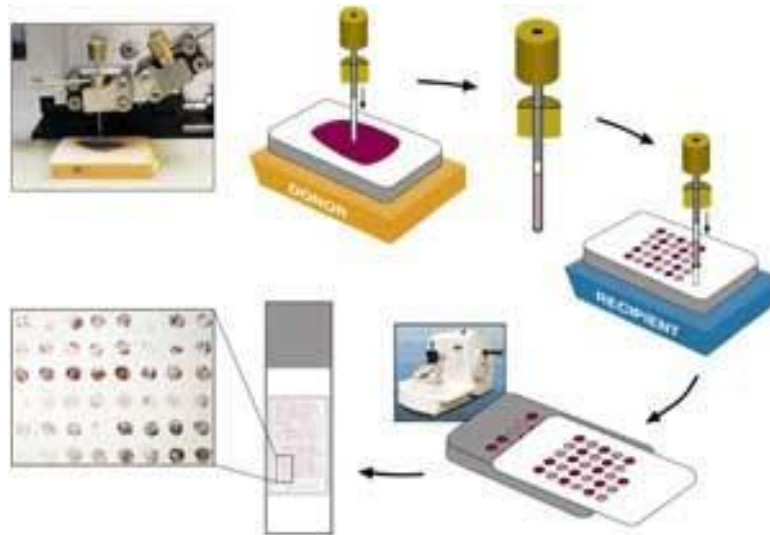


Abb. 1A: Die Abbildung zeigt das schrittweise Herstellen eines Tissue Microarrays.⁶⁶

3.2.1 ERSTELLUNG DER TMA

Als Erstes erfolgte eine schematische Erstellung der TMA mittels des Excel-Programms Windows 2013 (Abb. 1B). Hiermit war es möglich, die genaue Reihenfolge und Platzierung der einzelnen Gewebeprobe zu erfassen, damit diese später identifiziert werden können. Die in einem Paraffinblock eingebetteten Gewebe wurden mit den entsprechenden Hämatoxylin-Eosin(HE)-Schnittpräparaten aus dem pathologischen Archiv Rostock entnommen und anschließend wurden diese von einer Fachärztin für Pathologie mikroskopisch begutachtet. Sofern vorhanden, wurden Areale von Tumorgewebe auf dem Objektträger markiert, um diese beim Stanzvorgang des TMA mit dem dazugehörigen Paraffinblock (Spenderblock) zur Deckung zu bringen.⁶⁵ Die ausgestanzten Gewebeproben wurden ebenfalls in einen Paraffinblock (Empfängerblock) überführt, aus dem vorab ein festgelegter Bereich durch den identischen Stanzvorgang entnommen worden war (Abb. 1A).⁶⁵ Vom komplettierten Empfängerblock wurden 0,2-0,3µm dünne Paraffinschnitte für die nachfolgende immunhistochemische Untersuchung genommen.^{66,67} In der nachfolgenden Tabelle sind die Stanzanzahl und die verwendeten Gewebearten aufgeführt (Tab. 11).

Anzahl der Stanzen (ø 1,0 mm)	Gewebeart
3	Tumorgewebe
3	Normalgewebe
3	dysplastisches Gewebe
3	Carcinoma-in-situ-Gewebe
3	Gewebe der Lymphknotenmetastasen

Tab. 11: Aufgeführt sind die Anzahl der Stanzen je Gewebeprobe und die Art des entnommenen Gewebes aus dem Spenderblock.

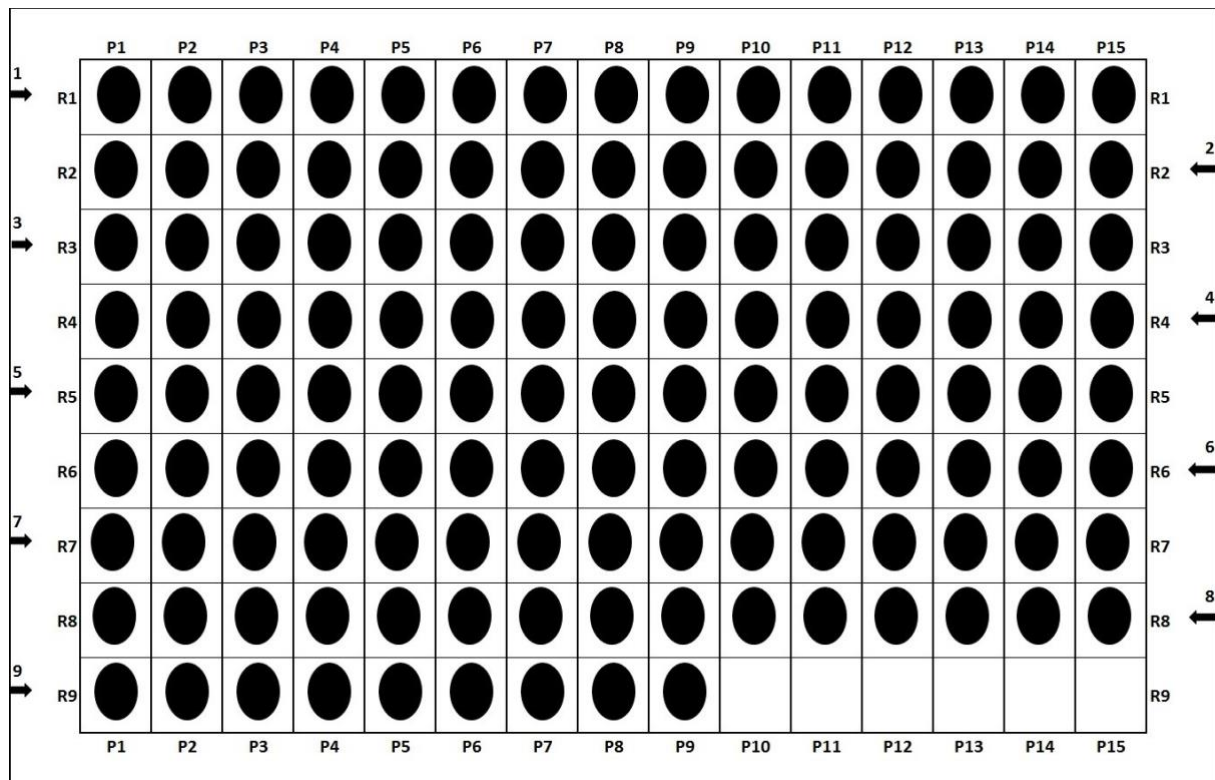


Abb. 1 B: Dargestellt ist der Konstruktionsplan eines TMA aus dieser Arbeit. Ziel ist die genaue Identifikation jeder einzelnen Gewebeprobe mit Hilfe des zuvor erstellten Konstruktionsplans, indem die Position, die Reihe und die Reihenfolge festgelegt werden.

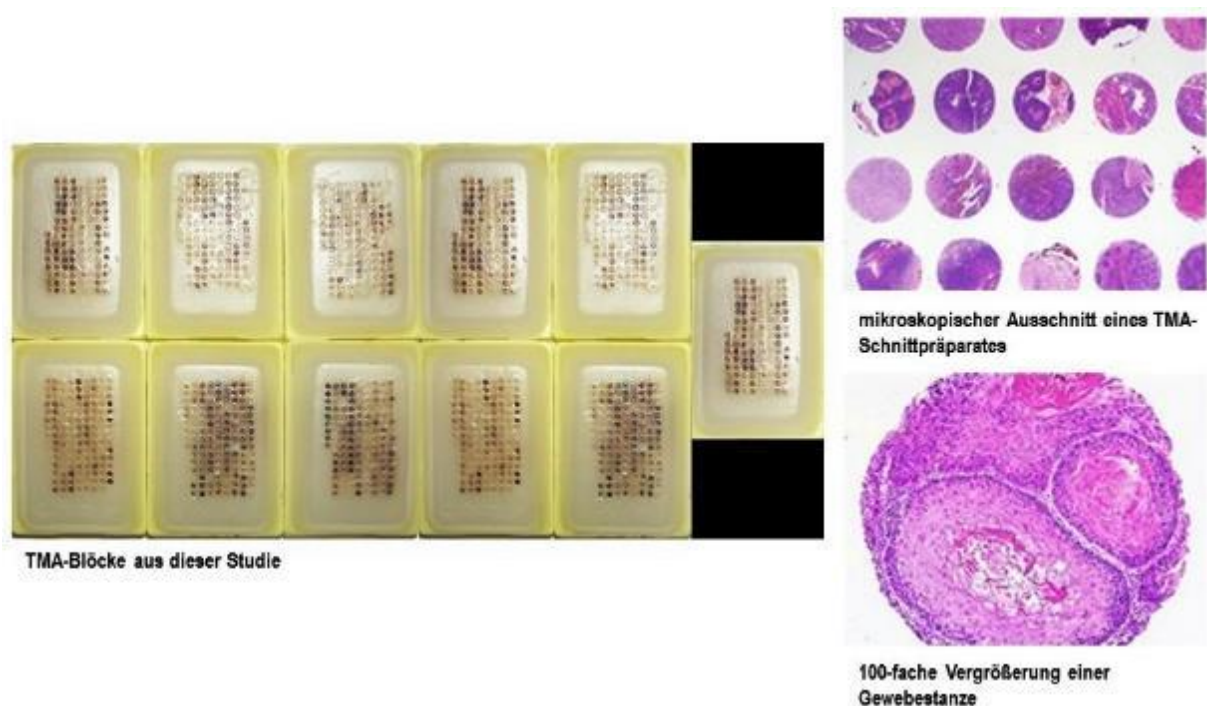


Abb. 2: Die Abbildungen zeigen die hergestellten TMA-Blöcke sowie zwei mikroskopische Bildaufnahmen aus der vorliegenden Arbeit.

3.3 IMMUNHISTOCHEMISCHES VERFAHREN

Es gibt viele verschiedene immunhistochemische (IHC) Verfahren, jedoch basieren alle auf der Affinität eines Primärantikörpers zu einem spezifischen Bereich (Isotope) eines extra- oder intrazellulär vorkommenden Antigens.⁶⁸ In dieser wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Methode angewendet, das die hohe Affinität des Avidins bzw. Streptavidins für Biotin ausnutzt.⁶⁹ Es bindet ein mit Biotin gekoppelter sekundärer Antikörper an den primären Antikörper.^{70,68} Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe eines Enzym-konjugierten (Strept)-Avidin-Biotin-Komplexes.⁷⁰ Das an diesen Komplex gebundene Enzym, die Peroxidase, wird mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht.⁷¹ Das am häufigsten verwendete Chromogen ist das Diaminobenzidin (DAB), welches auch in dieser Studie zum Einsatz kam.⁷¹

3.3.1 ERSTELLUNG DER HÄMATOXYLIN-EOSIN-SCHNITTPRÄPARATE

Zur Bestimmung des Tumoranteils je Stanze wurde vorab von jedem TMA ein 1-2 µm HE-Schnittpräparat mittels des Färbeautomaten der Firma Leica (Typ CV5030) nach Herstellerangaben angefertigt.

3.3.2 DURCHFÜHRUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBEMETHODE

Die IHC- wurde von Mitarbeitern des Institutes für Pathologie der Universität Rostock mit dem Färbearomaten der Firma Dako, dem Autostainer Link 48, durchgeführt. Vorab wurden 2-3 µm große Schnitte jedes TMA-Blocks auf beschichtete Objektträger überführt. Nach entsprechender Vorbehandlung erfolgte die automatisierte Immunfärbung für Antikörper gegen p16^{INK4} und p53 mit DAB als Chromogen (Tab. 12). Bei jeder Färbereihe wurden sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgeführt.

Protein	Antikörperklon	Hersteller	Verdünnung	Vorbehandlung
p53	Klon DO-7	Dako Germany GmbH	1:100	Tris/EDTA-Puffer, pH9, 20 min bei 97°C
p16^{INK4}	Klon G175-405	BD Pharmingen™	1:20	Tris/EDTA-Puffer, pH9, 20 min bei 97°C

Tab. 12: Aufgeführt sind die in dieser Studie verwendeten Antikörperklone mit ihrer jeweiligen Verdünnung und Vorbehandlung.

3.3.3 BEWERTUNGSKRITERIEN DER P16^{INK4A}- UND P53-FÄRBUNG

Die lichtmikroskopische Auswertung der p16^{INK4A}- und p53-Antikörperfärbung erfolgte zusammen mit Frau Dr. Zimpfer, einer Fachärztin für Pathologie, am Institut für Pathologie der Universität Rostock. Bewertet wurde die Kern- und die Zytoplasma-Färbung (Tab. 13).

Antikörperfärbung	0	1
p16^{INK4}	negativ < 10% Kern- und Zytoplasma-Färbung der Tumorzellen	positiv > 10% Kern- und Zytoplasma-Färbung der Tumorzellen
p53	negativ < 10% Kern- und Zytoplasma-Färbung der Tumorzellen	positiv > 10% Kern- und Zytoplasma-Färbung der Tumorzellen

Tab. 13: Lichtmikroskopische Bewertungskriterien der p16^{INK4A}- und p53-Färbung

3.4 BIOMOLEKULARES VERFAHREN

Die HPV-Analyse erfolgte ebenfalls am Institut für Pathologie der Universität Rostock. Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde aus Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeproben des

Karzinoms extrahiert, indem diese entparaffiniert und mit der Proteinkinase K aufgeschlossen wurden.²¹ Die DNA Reinigung erfolgte mit dem Wizard DNA Clean-up-System (Promega, Madison, WI) nach Anleitung. Vor der HPV-Subtypisierung erfolgte die Polymerasekettenreaktion (PCR), welche die mögliche HPV-DNA amplifizieren sollte.²¹ Die Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.²¹ Für die Identifikation der HPV-Typen wurde das HPV Type 3.5 LCD.Array Kit (Chipron, Germany) nach Herstellerangaben angewandt.

3.5 STATISTIK

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit der IBM SPSS Statistics 22.0 Software. Für einzelne Parameter wurde die deskriptive statistische Analyse angewandt. Von allen Parametern und Ergebnissen wurden der Durchschnittswert und die Standardabweichung ermittelt, sowie die absoluten und relativen Werte einzelner Faktoren. PFS und OS wurden mit der Kaplan-Meier Methode analysiert und mittels Log-Rank-Test berechnet. Um eine mögliche Korrelation zwischen den immunhistochemischen Färbeargebnissen und den klinisch-pathologische Parameter zu analysieren, kam der Pearson χ^2 Test zum Einsatz. Anhand der statistischen Testverfahren wurden alle p-Werte ermittelt. Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft.

IV. ERGEBNISSE

4.1 PATIENTENKOLLEKTIV

Aus der Datenbank des Instituts für Pathologie der Universität Rostock konnten 193 Fälle, bei denen ein Karzinom der Tonsilla palatina als Primärtumor diagnostiziert wurde, ermittelt werden. Bei 6 Fällen handelte es sich um ein Carcinoma in situ (Cis), dadurch ergaben sich veränderte Werte in der Gesamtzahl der Fälle ($n = 187$). Von diesen Fällen befanden sich im pathologischen Archiv 169 in Paraffin eingebettete Gewebeproben, die aus Biopsien und Resektionen der Gaumenmandel stammen. Außerdem lag von 27 Patienten Gewebematerial von Lymphknotenmetastasen vor. Die Gewebeproben stammten von Patienten, die in den Jahren 2000 bis 2013 in der Universitätsmedizin Rostock in Behandlung waren. Das Patientenalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung reichte von 36 bis 86 Jahre, mit einem Mittelwert (\pm Standardabweichung) von $58,02 \pm 9,8$ Jahren. Der Medianwert lag bei 59 Jahren. Das Patientenkollektiv umfasste 162 (83,9%) Männer und 31 (16,1%) Frauen. Dies entsprach einem Geschlechterverhältnis von 5:1.

4.2 KLINISCH-PATHOLOGISCHE DATEN

4.2.1 LOKALISATION

Das PEC war in 45,1% ($n = 47$) der Fälle in der rechten Tonsilla palatina, in 50,3% ($n = 97$) in der linken Gaumenmandel und in 4,7% ($n = 9$) beidseitig lokalisiert.

4.2.2 HISTOPATHOLOGISCHER DIFFERENZIERUNGSGRAD

Mit einem Prozentsatz von 49,2% ($n = 92$) lag im eingeschlossenen Patientenkollektiv ($n = 187$) am häufigsten ein undifferenzierte bzw. schlecht differenzierte PEC (G3/G4) vor. Das mäßig differenzierte PEC (G2) war zu 47,1% ($n = 88$) vertreten. Das gut differenzierte PEC (G1) war mit 3,7% ($n=7$) am seltensten (Tab. 14). Die nachfolgende mikroskopische Abbildung zeigt die unterschiedlichen Differenzierungsgrade der Tonsillenkazinome (Abb. 3).

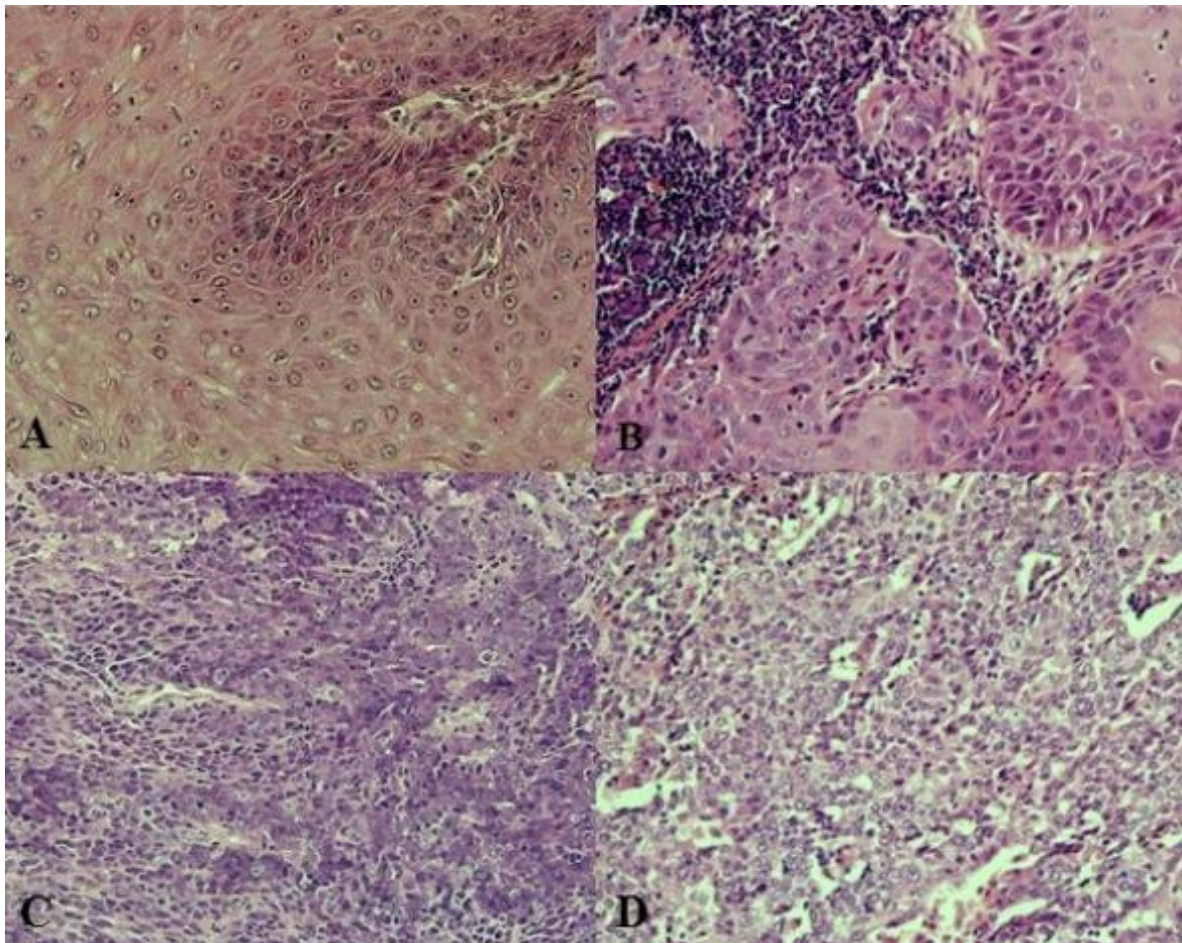


Abb.3: Die Abbildung zeigt die verschiedenen histopathologischen Differenzierungsgrade der PEC der Gaumenmandel (A: G1, B: G2, C: G3, D: G4, 200-fache Vergrößerung; (Aufnahmen aus dieser Studie).

4.2.3 HISTOPATHOLOGISCHER SUBTYP

Mit 63,7% (n = 123) war die überwiegende Mehrheit der PEC vom nicht bzw. gering verhornenden Typ (Tab. 14). Als zweithäufigster Subtyp wurde mit 19,7% (n = 38) das verhornende Karzinom ermittelt. Das lymphoepitheliale PEC (5,7%) und das basaloide Ca (4,7%) lagen in Bezug auf ihre Häufigkeit eng beieinander. Das spindelzellige PEC war mit 3,1% (n = 6) am geringsten vertreten. Die absolute und prozentuale Verteilung der Subtypen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 14).

Differenzierungsgrad	Häufigkeit	Prozent (%)
G1	7	3,7
G2	88	47,1
G3/G4	92	49,2
gesamt	187	100

histopathologischer Subtyp	Häufigkeit	Prozent (%)
nicht/gering verhornendes PEC	123	65,8
lymphoepitheliales PEC	11	5,9
basaloides Karzinom	9	4,8
verhornendes PEC	38	20,3
spindelzelliges PEC	6	3,2
gesamt	187	100

Tab. 14: Tabellarisch dargestellt ist die absolute und prozentuale Verteilung der Differenzierungsgrade und der Subtypen von Karzinomen der Tonsilla palatina. Das Gesamtkollektiv umfasste 193 Fälle, jedoch handelte es sich bei 6 Fällen um ein Carcinoma in situ (Cis), dadurch ergaben sich veränderte Werte in der Gesamtzahl (n = 187).

4.2.4 TNM-KLASSIFIKATION UND UICC-STADIENGRUPPIERUNG

Beim Vergleich der Tumorgröße nahm die T-Kategorie II mit 42% (n = 55) den größten Anteil ein (Tab. 15). Insgesamt lag in 80,7% (n = 134) der Fälle ein positiver Lymphknotenmetastasen-Befund vor. Als häufigste Lymphknotenmetastasen-Kategorie (N-Kategorie) wurde die N2b mit 37,1% (n = 46) ermittelt (Tab. 15). Eine Fernmetastasierung (M1-Kategorie) lag bei 12,1% (n = 12) vor. Außerdem wurde bei 33,9% (n = 20) eine Lymphgefäßinvasion (L) festgestellt. Eine Veneninvasion (V) lag bei 14,5 % (n = 8) und eine perineurale Invasion (Pn) bei 11,1% (n = 2) der Proben vor. Die Analyse der Verteilung der Tumorstadien gemäß der UICC-Klassifikation ergab, dass das Stadium IVa mit 56% (n = 89) am häufigsten vertreten war (Tab.15). Weitere Daten bezüglich der TNM-Klassifikation und der UICC-Stadien sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 15).

pT-Kategorien	Häufigkeit	Prozent (%)
Cis	6	4,5
I	25	18,7
II	55	41,4
III	34	25,6
IV	13	9,8
gesamt	133	100

pN-Kategorien	Häufigkeit	Prozent (%)
N0	24	19,4
N1	23	18,5
N2a	13	10,5
N2b	46	37,1
N2c	18	14,5
gesamt	124	100

cM-Kategorien	Häufigkeit	Prozent (%)
cM0	109	87,9
cM1	15	12,1
gesamt	124	10

UICC-Stadiengruppierung	Häufigkeit	Prozent (%)
0	4	2,5
I	7	4,4
II	12	7,5
III	27	17
IVa	89	56
IVb	4	2,5
IVc	16	10,1
gesamt	159	100

Tab.15: Absolute und prozentuale Verteilung der TNM-Kategorien und der UICC-Stadien des PEC der Tonsilla palatina

4.2.5 RESIDUALTUMOR-KLASSIFIKATION

Die folgende Tabelle zeigt die absolute und prozentuale Verteilung der Residualtumore. Davon wurden 45,1% (n = 23) als mikroskopische Residualtumore (R1) und 3,9% (n = 2) als makroskopische Residualtumore eingestuft (R2) (Tab. 16).

R-Kategorien	Häufigkeit	Prozent (%)
R0	26	51
R1	23	45,1
R2	2	3,9
gesamt	51	100

Tab.16: Absolute und prozentuale Verteilung der Residualtumore des PEC der Tonsilla palatina

4.2.6 NIKOTIN- UND ALKOHOLANAMNESE

Die folgenden Kreisdiagramme veranschaulichen die Nikotin- und Alkoholanamnese des Kollektivs. Zum Zeitpunkt der Diagnose konsumierten 62,2% (n = 107) der Patienten Nikotin (Abb. 4A). Des Weiteren gaben 63,5% (n = 101) der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose an, täglich Alkohol zu trinken (Abb. 4B). Das Nichtraucherkollektiv umfasste sowohl Nichtraucher als auch Patienten, die in der Vergangenheit geraucht (20,9%) hatten. Im Patientenkollektiv ohne Alkoholkonsum waren auch trockene Alkoholiker (26,3%) enthalten.

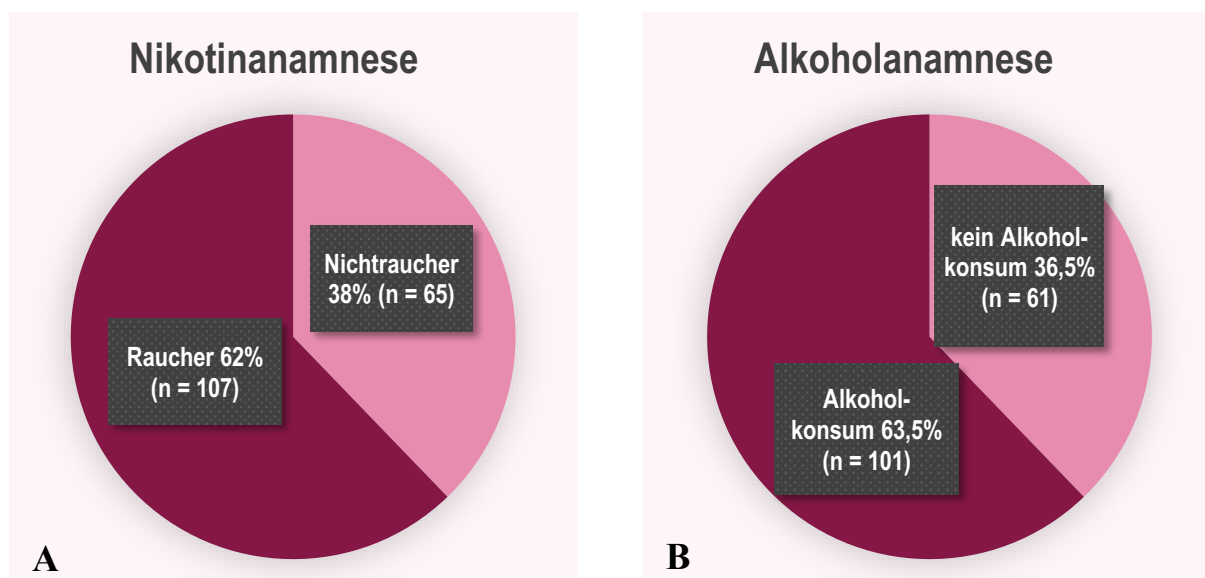


Abb. 4A, B: Die Kreisdiagramme zeigen die Nikotin- und Alkoholanamnese des untersuchten Patientenkollektivs zum Zeitpunkt der Diagnose.

4.2.7 REZIDIV

Bei 36,8 % (n=46) der Patienten trat im Zeitraum nach den primären therapeutischen Maßnahmen ein Rezidiv auf (Tab.17).

Rezidiv	Häufigkeit	Prozent (%)
kein Rezidiv	79	63,2
Rezidiv	46	36,8
gesamt	125	100

Tab. 17: Absolute und prozentuale Angaben zum Auftreten von Rezidivtumoren des PEC der Tonsilla palatina

4.3 AUSWERTUNG DER TMA

Mit Hilfe des Tissue-Microarray(TMA)-Verfahrens konnte das Karzinomgewebe (n = 169) auf 11 TMA-Blöcke überführt werden. Davon wurden 10 für das Tonsillen-Karzinomgewebe verbraucht. Das Gewebe der Lymphknotenmetastasen wurde auf einen separaten TMA-Block überführt. Insgesamt lagen 1.401 Gewebestanzungen vor. Von insgesamt 169 Fällen waren 166 (98,2%) auswertbar. Bei den verbliebenen 3 Fällen (0,8%) ließ sich kein Tumorgewebe im Schnittpräparat diagnostizieren. Das Gewebe der Lymphknotenmetastasen war in 96% (n = 26) der Fälle auswertbar. Die vergleichsweise geringe Anzahl der Ausfälle kam dadurch zustande, dass jedes Karzinomgewebe pro Fall dreimal gestanzt wurde.

4.4 AUSWERTUNG DER P16^{INK4A}- UND P53 –FÄRBEERGEBNISSE

Bei insgesamt 77,1% (n = 128) der Proben war die p16^{INK4A}-Antikörperfärbung positiv. 43,4% (n = 72) dieser Fälle hatten eine schwache bis moderate Zytoplasma-Färbung, jedoch keine positive Kernfärbung. Aus diesem Grund wurden sie als negativ gewertet. Bei 22,9% (n = 38) war weder eine Zytoplasma-Färbung noch eine positive Kernfärbung erkennbar (Tab. 18, Abb. 5A). Eine moderate bis starke Zytoplasma- und Kernfärbung in mehr als 10% des Tumorgewebes wurde bei 33,7% (n = 56) der Proben festgestellt. Im gesunden Schleimhautgewebe zeigte sich fokal eine schwache Zytoplasma-Färbung für den p16^{INK4A}-Antikörper. Eine positive p53-Antikörperfärbung wurde bei 37,3% (n = 62) ermittelt (Tab. 18, Abb. 5B). Im Falle der p53-Färbung musste bei mehr als 10% des Tumorgewebes eine starke Kernfärbung festgestellt werden, um als positiv gewertet zu werden. Die absolute und prozentuale

Verteilung der p16^{INK4A}- und p53-Färbeergebnisse ist in der nachfolgenden Tabelle sowie in den Kreisdiagrammen dargestellt (Tab.18, Abb. 5A,B).

Antikörperfärbung	Bewertungskriterien	Häufigkeit	Prozent (%)
p16^{INK4A} positiv	moderate bis starke Zytoplasma- und Kernfärbung (> 10% Tumorgewebe)	56	33,7
p16^{INK4A} negativ	schwache bis moderate Zytoplasma- und keine Kernfärbung	72	66,3
	keine Zytoplasma- und keine Kernfärbung	38	
p53 positiv	starke Kernfärbung und moderate Zytoplasma-Färbung (> 10% Tumorgewebe)	62	37,3
p53 negativ	keine Zytoplasma- und keine Kernfärbung	104	62,7

Tab. 18: Absolute und prozentuale Verteilung der p16^{INK4A}- und p53-Färbeergebnisse

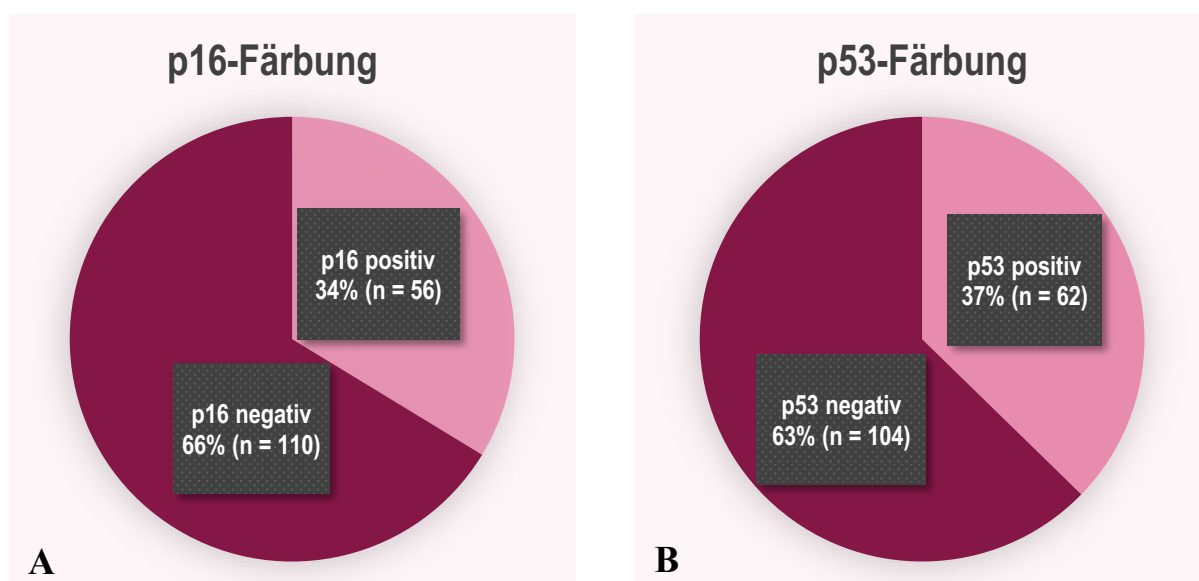


Abb. 5 A, B: Die Kreisdiagramme zeigen die absolute und prozentuale Verteilung der p16^{INK4A}- und p53-Färbeergebnisse des PEC-Kollektivs der Gaumenmandel.

4.5 VERGLEICH DER p16^{INK4A}- UND p53-FÄRBEERGEBNISSE JE FALL

Der Vergleich der p16^{INK4A} und p53-Färbung zeigte in einigen Fällen eine positive Färbung für beide Antikörper. Das nachfolgende Kreisdiagramm veranschaulicht die absolute und prozentuale Verteilung

beider Antikörper je Fall (Abb. 6). 25,3% (n = 42) der Patienten hatten eine alleinige positive p16^{INK4A}-Färbung, 28,9% (n = 48) waren nur p53-positiv (Abb. 6). Außerdem wurde bei 37,4% (n = 62) weder eine positive p16^{INK4A}- noch eine positive p53-Färbung erfasst. Die simultane Färbung für beide Antikörper wurde bei 8,4% (n = 14) der Proben festgestellt. Nach der erneuten mikroskopischen Begutachtung wiesen die Fälle mit einer simultanen Färbung eine heterogene Kernfärbung und eine starke Zytoplasma-Färbung für den p16^{INK4A}-Antikörper auf. Die p53-Positivität ergab sich aus der starken Kernfärbung. In den nachfolgenden lichtmikroskopischen Bildern wird der Vergleich der p16^{INK4A} und p53-Färbung bildlich dargestellt (Abb. 7-10). Wegen der unklaren Wertigkeit der Fälle mit einer Expression für beide Antikörper wurde eine HPV-Analyse durchgeführt (Abschnitt 4.6).

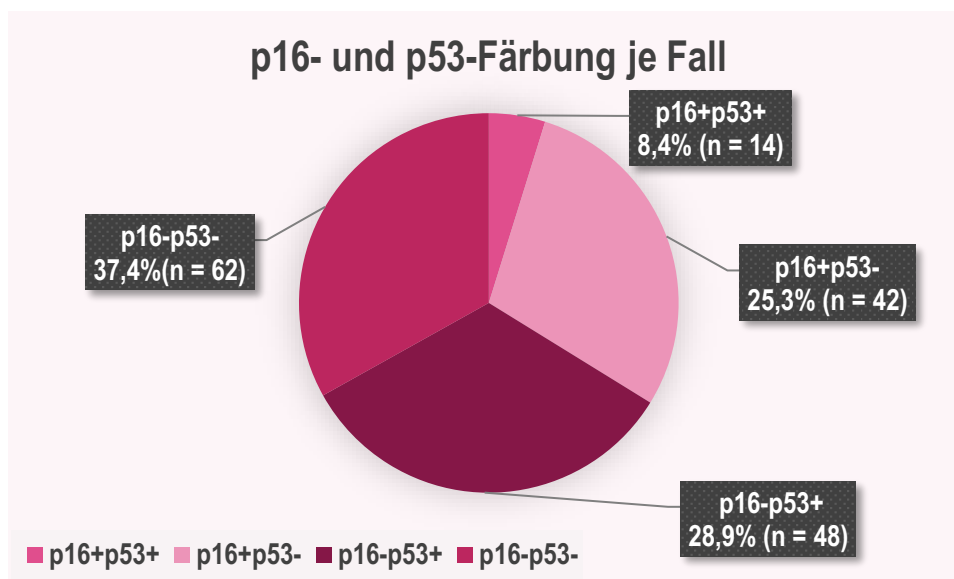


Abb. 6: Absolute und prozentuale Verteilung der p16^{INK4A}- und p53-Färbung je Fall

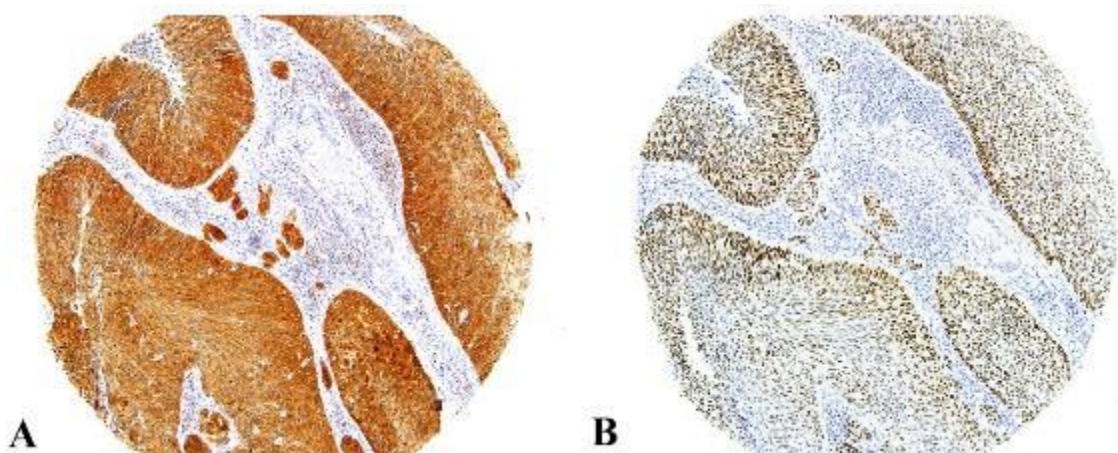


Abb. 7A, B: Dargestellt ist ein Fall mit simultaner Expression der Antikörper (p16+p53+); Bild A zeigt die starke Zytoplasma-Färbung des p16^{INK4A}-Antikörpers. Bild B zeigt eine starke Kernfärbung des p53-Antikörpers (Bild A: p16^{INK4A}-Expression, Bild B: p53-Expression, 100-fache Vergrößerung). Herkunft: TMA 2 Reihe 7 Position 6 (Aufnahmen aus dieser Studie)

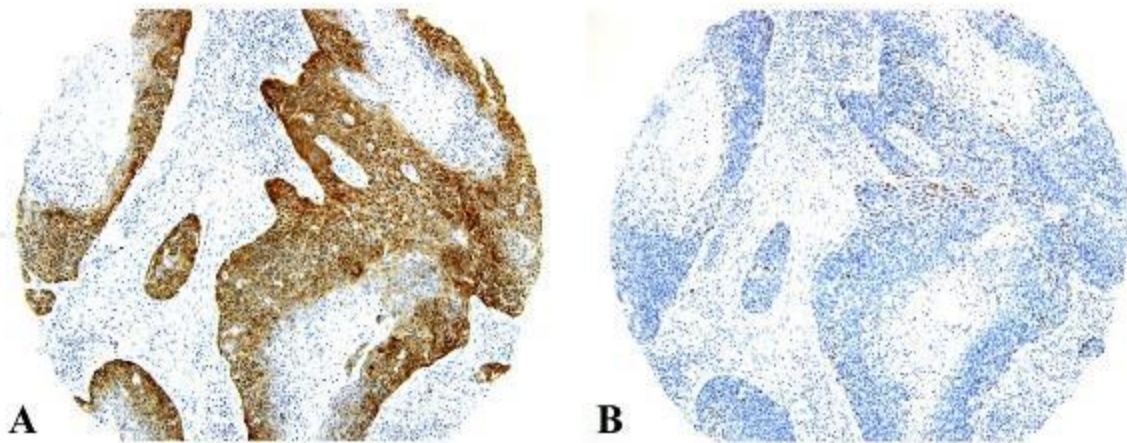


Abb. 8A, B: Dieses Bild zeigt einen Fall mit einer positiven p16^{INK4A}-Färbung und einer negativen Antikörperfärbung gegen p53 (p16+p53-). (Bild A: p16^{INK4A}-Expression, Bild B: p53-Expression, 100-fache Vergrößerung). Herkunft: TMA 1 Reihe 2 Position 14 (Aufnahmen aus dieser Studie)

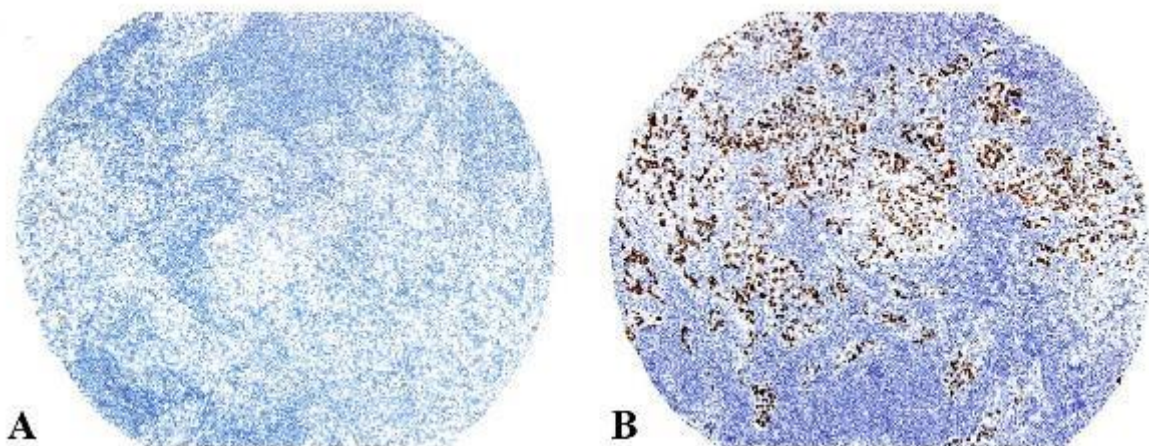


Abb. 9A, B: Dargestellt ist ein Fall mit einer ausschließlichen Positivität gegen den p53-Antikörper (p16-p53+). Bild A: p16-Expression, Bild B: p53-Expression, 100-fache Vergrößerung). Herkunft: TMA 1 Reihe 3 Position 12 (Aufnahmen aus dieser Studie)

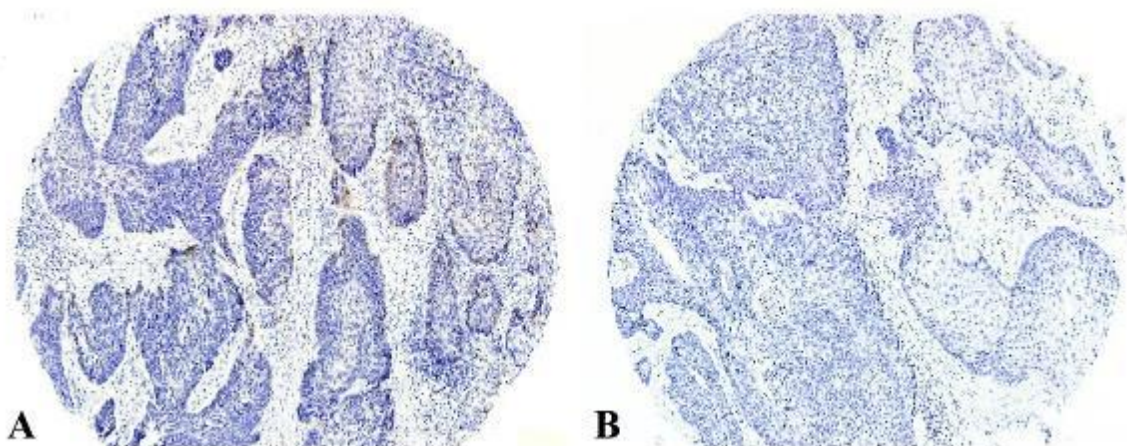


Abb. 10A, B: Dieses Bild zeigt einen Fall mit negativer Färbung gegen beide Antikörper (p16p53-). (Bild A: p16^{INK4A}-Expression, Bild B: p53-Expression, 100-fache Vergrößerung). Herkunft: TMA 2 Reihe 4 Position 1 (Aufnahmen aus dieser Studie)

4.6 HPV-ANALYSE

Die HPV-Analyse und -Subtypisierung wurde in den Fällen durchgeführt, die eine positive Expression für beide Antikörper gezeigt hatten. Insgesamt wurden 14 Proben mit doppelt positiver Antikörperfärbung erfasst, also mit einer simultanen p16^{INK4A}- und p53-Positivität. Fünf Fälle konnten aufgrund ihres zu geringen DNA-Gehalts nicht in die HPV-Analyse einbezogen werden. Von wiederum 2 Fällen war das Tumorgewebe in den vorangegangenen Untersuchungen verbraucht worden. Demnach konnten 7 Fälle auf ihren HPV-Status untersucht werden, von denen 5 HPV-positiv waren (Tab. 19). Durch die Subtypisierung wurden 4 Fälle mit dem HPV-Hochrisikotyp 16 und ein Fall mit dem Subtyp 35 und 16 ermittelt (Tab. 19).

HPV-Analyse	Anzahl
Subtyp 16	4
Subtyp 16/35	1
HPV negativ	2

Tab. 19: Ergebnisse der HPV-Analyse von Fällen, die eine simultane Färbung für Antikörper gegen p16^{INK4A} und p53 zeigten.

4.7 FÄRBEERGEBNISSE: PRIMÄRTUMOR UND METASTASE

Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse des Vergleichs von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen hinsichtlich der p16^{INK4A}- und p53-Färbung (Abb. 11). In Bezug auf die p16^{INK4A}-Expression wiesen die Primärtumore und die dazugehörigen Metastasen eine identische Expression auf (Abb. 11). Das nachfolgende lichtmikroskopische Bild veranschaulicht die p16^{INK4A}-Expression eines Primärtumors und dessen Lymphknotenmetastase (Abb. 12A, B). Beim Vergleich der p53-Färbung der Primärtumore und deren Metastasen zeigte sich in 3 Fällen eine unterschiedliche Expression (Abb. 11).

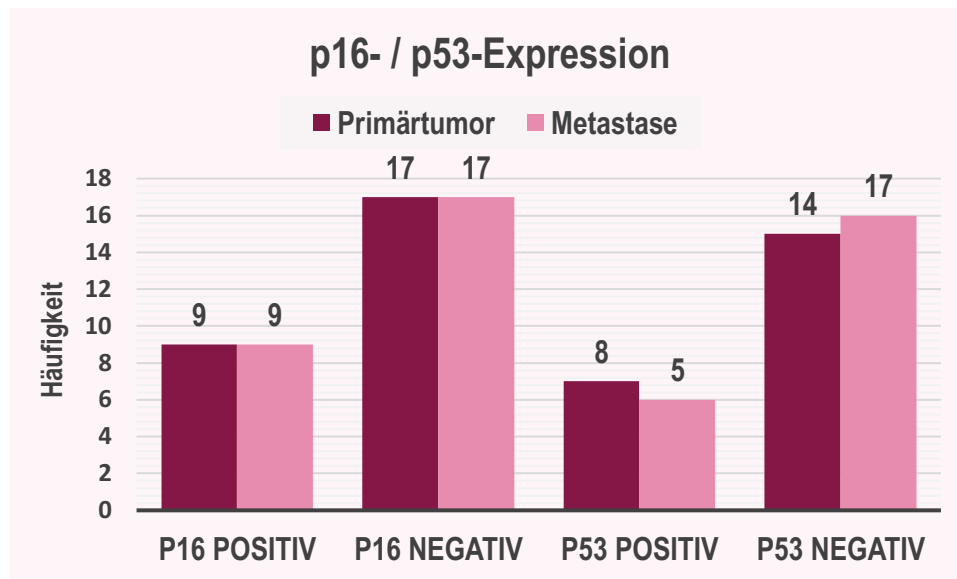


Abb. 11: Vergleich der p16^{INK4A}- und p53-Färbeergebnisse der Primärtumore und der Lymphknotenmetastasen

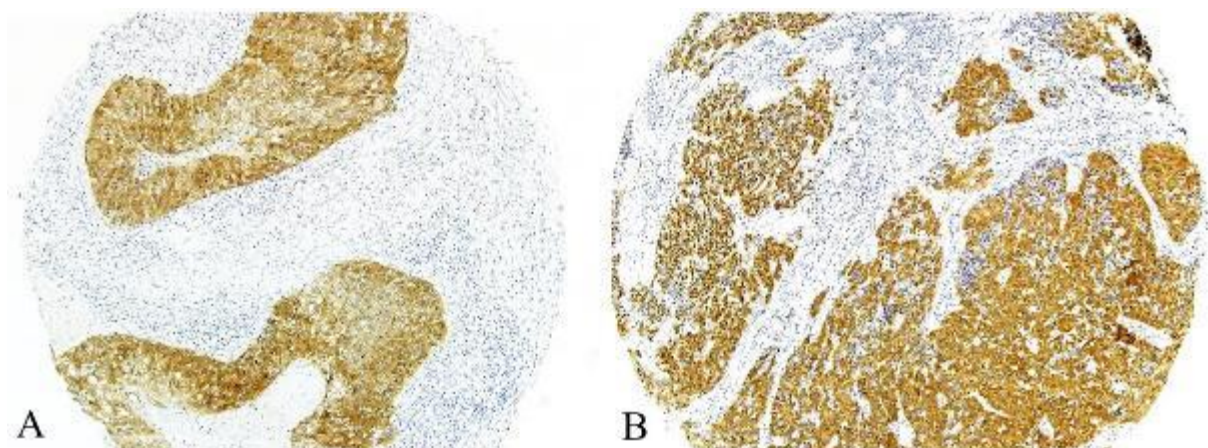


Abb. 12A, B: p16^{INK4A}-Expression eines Primärtumors und dessen Metastase. (A: Metastase, B: Primärtumor, 10-fache Vergrößerung) Herkunft: Bild A TMA Met R7P8, Bild B TMA 9 R7P8 (Aufnahmen aus dieser Studie)

4.8 KORRELATIONSANALYSE

4.8.1 HISTOPATHOLOGISCHER DIFFERENZIERUNGSGRAD

Die nachfolgenden Abbildungen veranschaulichen die Korrelation der immunhistochemischen Färbeargebnisse mit den Differenzierungsgraden (Abb. 13, Tab. 20). In Abbildung 13A sind die Ergebnisse der Korrelation der Differenzierungsgrade mit der p16^{INK4A}-Expression dargestellt. Von den p16^{INK4A}-positiven Karzinomen waren 61,1% (n = 33) schlecht und 38,9% (n = 21) mäßig differenziert (Abb. 13A). Im Gegensatz dazu waren 39,6% (n = 40) der p16^{INK4A}-negativen Karzinome vom schlecht differenzierten und 56,4% (n = 57) vom mäßig differenzierten Typ. Die deskriptive Analyse ermittelte beim Vergleich des Differenzierungsgrads in Abhängigkeit von der p16^{INK4A}-Antikörperfärbung eine Signifikanz (p = 0,021). In Abbildung 13B sind die Ergebnisse der Korrelation der Differenzierungsgrade mit der p53-Expression abgebildet. 37,5% (n = 21) der p53-positiven Karzinome waren schlecht und 58,9 % (n = 33) mäßig differenziert (Abb. 13B, Tab. 20). Statistisch ergab die Korrelation der Differenzierungsgrade mit der p53-Expression keinen signifikanten Wert (p = 0,188).

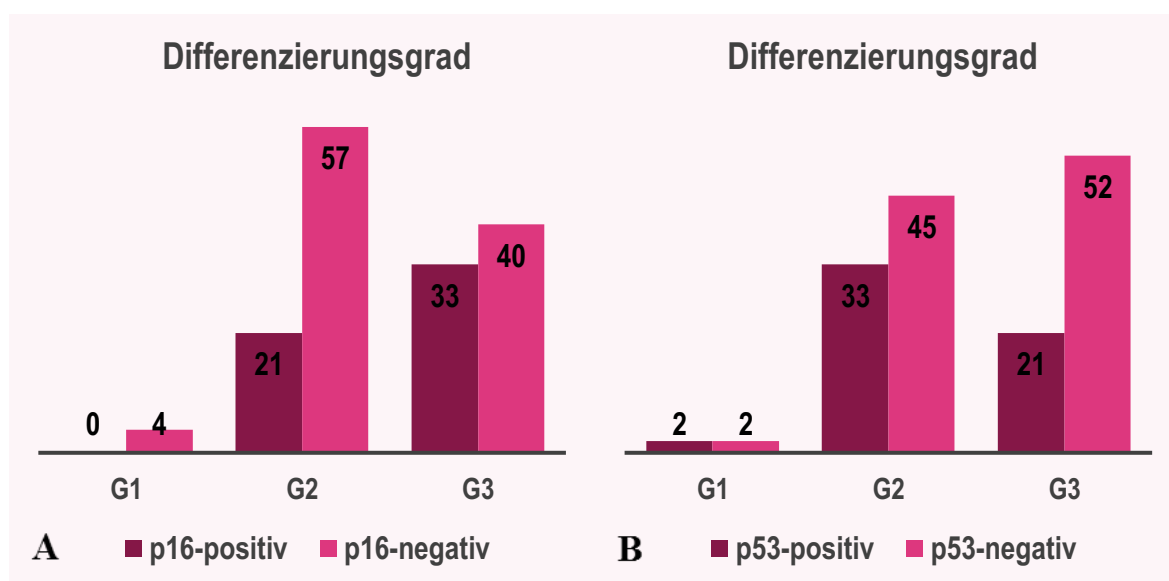


Abb. 13A, B: Verteilung des pathologischen Differenzierungsgrad in Bezug auf die p16^{INK4A}- und p53-Färbeargebnisse

Differenzierungsgrad	p16 ^{INK4} positiv %	p16 ^{INK4} negativ %	p53 positiv %	p53 negativ %
G1	0 (n= 0)	4 (n=4)	3,6 (n= 2)	2 (n=2)
G2	38,9 (n=21)	56,4 (n=57)	58,9 (n=33)	45,5 (n=45)
G3	61,1 (n=33)	39,6 (n=40)	37,5 (n=21)	52,5 (n=52)
gesamt	100 (n=54)	100 (n=101)	100 (n=56)	100 (n=99)

Tab. 20: Verteilung der Differenzierungsgrade in Bezug auf die p16^{INK4A}-/p53-Färbeargebnisse

4.8.2 HISTOPATHOLOGISCHER SUBTYP

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Korrelation der immunhistochemischen Färbeergebnisse mit den histopathologischen Subtypen. Die Mehrheit der p16^{INK4A}-positiven Karzinome war mit 71,4% (n = 40) vom nicht bzw. gering verhornenden Typ und bei 17,9% (n = 10) handelte es sich um verhornende PEC. Eine ähnliche Verteilung wurde bei den p16^{INK4A}-negativen Karzinomen ermittelt (Tab. 21). In Bezug auf die p53-Positivität waren 62,7% (n = 37) vom nicht bzw. gering verhornendem Typ und 22% (n = 13) verhornende PEC (Tab.21). Die Korrelation des histopathologischen Subtyps mit der p16^{INK4A}- und der p53-Expression ergab in der statistischen Analyse keine Signifikanz (p16^{INK4A}: p = 0,721; p53: p = 0,352).

histopathologische Subtypen	p16 ^{INK4} positiv	p16 ^{INK4} negativ	p53 positiv	p53 negativ
nicht /gering verhornendes PEC	71,4 (n = 40)	66,9 (n = 71)	62,7 (n = 37)	71,8 (n = 74)
verhornendes PEC	17,9 (n = 10)	20,8 (n = 22)	22,0 (n = 13)	18,4 (n = 19)
basaloides PEC	5,4 (n = 3)	4,7 (n = 5)	5,1 (n = 3)	4,9 (n = 5)
spindelzelliges PEC	3,6 (n = 2)	3,8 (n = 4)	6,8 (n = 4)	1,9 (n = 2)
lymphoepitheliales PEC	1,7 (n = 1)	3,8 (n = 4)	3,4 (n = 2)	2,9 (n = 3)
gesamt	(n = 56)	(n = 106)	(n = 59)	(n = 103)

Tab. 21: Verteilung der Subtypen in Bezug auf die p16^{INK4A}- und p53-Färbung

4.8.3 NIKOTINANAMNESE

Die Kreisdiagramme veranschaulichen die Korrelation der p16^{INK4A}- und p53-Expression mit der Nikotinanamnese (Abb. 14A, B, 15A, B). Abbildung 14A ist zu entnehmen, dass 60% (n = 34) der Nichtraucher p16^{INK4A}-positive Karzinome aufwiesen (Abb. 14A, Tab. 22). Im Unterschied dazu hatten nur 20% der Raucher p16^{INK4A}-positive Tumore (Abb.14B, Tab. 22). In der statistischen Analyse wurde eine inverse Korrelation zwischen einer positiven Nikotinanamnese und p16^{INK4A}-Positivität festgestellt (p < 0,001) (Abb. 14, Tab. 22). Die Kreisdiagramme in Abbildung 15 zeigen, dass bei 48% (n = 44) der Raucher p53-positive Karzinome vorlagen. Im Gegensatz dazu waren nur 21 % (n = 12) der Karzinome der Nichtraucher p53-positiv (Abb.15, Tab. 23). In der statistischen Analyse wurde eine signifikante Korrelation zwischen einer positiven Nikotinanamnese und der p53-Positivität ermittelt (p = 0,001) (Abb.15, Tab. 23).

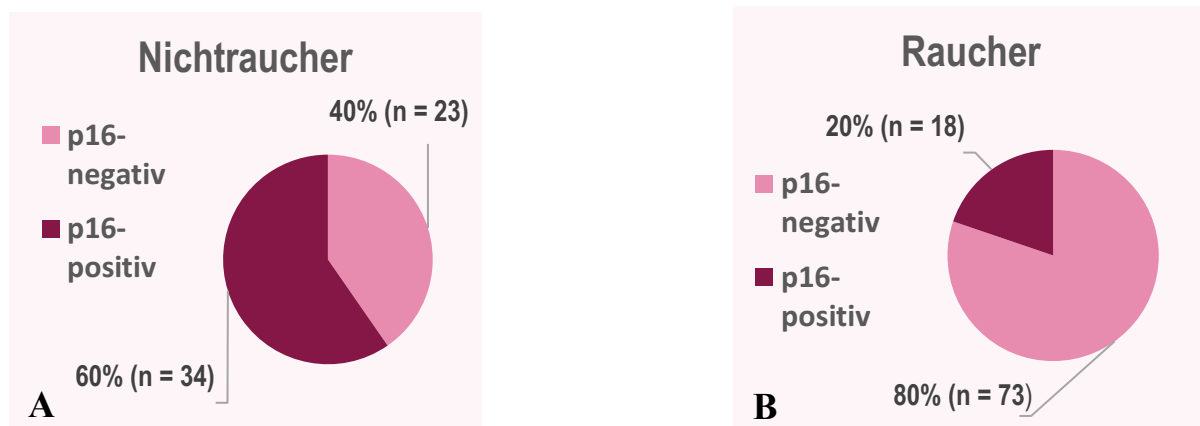


Abb. 14A, B: Korrelation der p16^{INK4A}-Färbeergebnisse mit der Nikotinanamnese

Nikotinanamnese	p16 ^{INK4} positiv %	p16 ^{INK4} negativ %	gesamt (n=148)
Nichtraucher	60 (n = 34)	40 (n = 23)	100 (n = 57)
Raucher	20 (n = 18)	80 (n = 73)	100 (n = 91)

Tab. 22: Absolute und prozentuale Verteilung der p16^{INK4A}-Färbeergebnisse in Bezug zur Nikotinanamnese

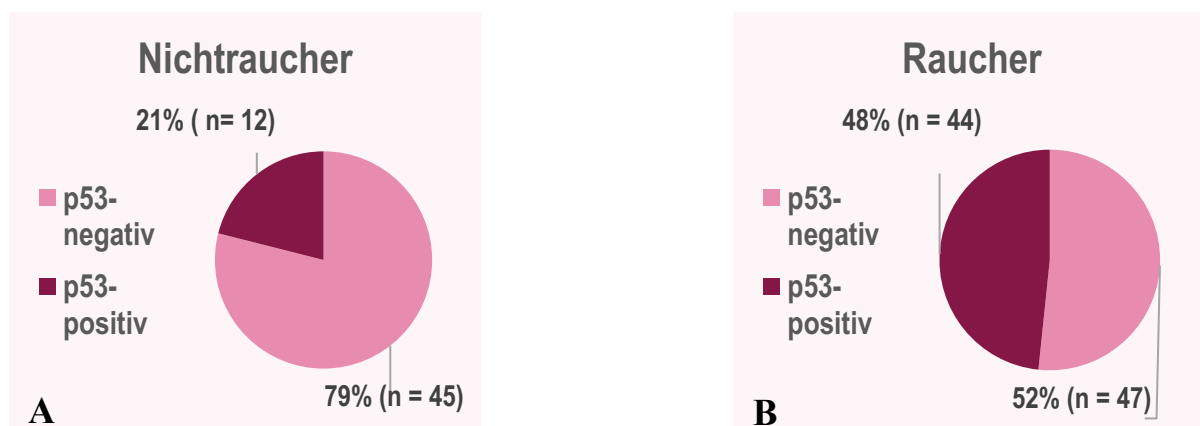


Abb. 15A, B: Korrelation der p53-Färbeergebnisse mit der Nikotinanamnese

Nikotinanamnese	p53 positiv %	p53 negativ %	gesamt (n=148)
Nichtraucher	21 (n = 12)	79 (n = 45)	100 (n = 57)
Raucher	48 (n = 44)	52 (n = 47)	100 (n = 91)

Tab. 23: Absolute und prozentuale Verteilung der p53-Färbeergebnisse in Bezug zur Nikotinanamnese

4.8.4 LYMPHKNOTENMETASTASEN-BEFUND

Die folgende Tabelle zeigt die Korrelation des Lymphknotenmetastasen-Befundes mit der p16^{INK4A}- und p53-Färbung (Tab. 24). Von den Fällen, bei denen Metastasen ermittelt wurden, waren 37,4 % (n = 43) p16^{INK4A}-positiv und 62,6% (n = 72) p16^{INK4A}-negativ (Tab. 24). Eine ähnliche Verteilungsrate wurde bei der p53-Expression ermittelt (Tab. 24). Die Korrelation des Lymphknotenmetastasen-Befundes mit jeweils beiden Färbungen war statistisch nicht signifikant (p16^{INK4A}:p = 0,642; p53: p = 0,202).

Metastasen	p16 ^{INK4} positiv %	p16 ^{INK4} negativ %	p53 positiv %	p53 negativ %	gesamt (n = 128)
keine Metastasen	30,8 (n = 4)	69,2 (n = 9)	53,8 (n = 7)	46,2 (n = 6)	100 (n = 13)
Metastasen vorhanden	37,4 (n = 43)	62,6 (n = 72)	35,7 (n = 41)	64,3 (n = 74)	100 (n = 115)

Tab. 24: Tabellarische Darstellung der prozentualen und absoluten Häufigkeit des Lymphknotenbefundes in Bezug zur p16^{INK4A}- und p53-Färbung

Weitere statistische Korrelationen der klinisch-pathologische Parameter mit den p16^{INK4A}- und p53-Färbeergebnissen ergaben keine signifikanten Werte (p > 0,05). Die untersuchten Parameter und ihre p-Werte sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (Tab. 25).

Parameter	p16 ^{INK4A} -Expression	p53-Expression
	p-Wert	p-Wert
pT-Kategorien	0,304	0,819
pN-Kategorien	0,496	0,916
pM-Kategorien	0,682	0,933
pL-Befund	0,584	0,879
pV-Befund	0,793	0,584
Grading (G1-G3)	0,021	0,188
pPn-Befund	0,849	0,468
UICC-Stadien	0,934	0,707
R-Klassifikation	0,896	0,533
Rezidiv	0,817	0,319
Lymphknotenmetastasen	0,642	0,202
Subtyp	0,721	0,352
Nikotinanamnese	< 0,001	0,001
Alkoholanamnese	0,322	0,416

Tab. 25: Aufgeführt sind die Parameter und ihre p-Werte, die in der statistischen Analyse ermittelt wurden. Die signifikanten Werte sind gelb markiert.

4.9 ÜBERLEBENSANALYSEN

Um die prognostische Relevanz der Färbeergebnisse sowie der ermittelten klinisch-pathologischen Parameter zu bestimmen, wurde das Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreie Überleben (PFS) des Patientenkollektivs mittels uni- und multivariater Analysen berechnet. Zunächst wurden beide Endpunkte in Abhängigkeit von den Färbeergebnissen (p16^{INK4A},p53), den histopathologischen Differenzierungsgraden, den histopathologischen Subtypen, der Tumorausdehnung (pT-Kategorien), dem Lymphknotenmetastasen-Befund (pN-Kategorien), dem Fernmetastasenbefund (pM-Kategorien), der Stadiengruppierung der Karzinome bezüglich der TNM-Kategorien (UICC-Stadien) und der Nikotin- und Alkoholanamnese durch univariate Analysen berechnet und mittels Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt. Anschließend erfolgten multivariate Analysen des OS und PFS unter Berücksichtigung weiterer Parameter. 137 Patienten wurden in die Verlaufsbeobachtung (Spanne: 0 bis 141 Monate) für das Gesamtüberleben einbezogen. Die mediane Überlebenszeit lag bei 27 Monaten. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug 26%. Des Weiteren konnten 125 Patienten für die Verlaufsbeobachtung (Spanne: 2 bis 141 Monaten) des PFS berücksichtigt werden. Im Median lag das PFS bei 23 Monaten. Als 5-Jahres-PFS-Rate wurden 26% ermittelt.

4.9.1 UNIVARIATE ANALYSEN

Die univariate Analyse ergab einen hochsignifikanten Überlebensvorteil für Patienten mit p16^{INK4A}-positiven Karzinomen ($p < 0,001$) (Abb. 16A). Die 5-Jahres-Überlebensrate lag in dieser Patientengruppe bei 72% (Abb. 16A). Im Gegensatz dazu wurde für Patienten mit p16^{INK4A}-negativen Karzinomen eine 5-Jahres-Überlebensrate von 34% ermittelt. Auch die Patienten mit p53-negativen TCa hatten einen signifikanten Überlebensvorteil ($p = 0,035$) (Abb. 16B). Die 5-Jahres-Überlebensrate lag in diesem Kollektiv bei 58%. Im Gegensatz dazu betrug sie bei den Patienten mit p53-positivem Karzinom 40% (Abb. 16B). Die Überlebenskurve der Patienten mit negativer Färbung für beide Antikörper zeigte einen ähnlichen Verlauf wie für die Patienten mit p53-Expression. Dies wird in der Kaplan-Meier-Kurve der p16^{INK4A}/p53 Expressionsprofile grafisch verdeutlicht (Abb. 17A). Die univariate Analyse ermittelte in Bezug auf den pathologischen Lymphknotenmetastasen-Befund (pN-Kategorien) ($p = 0,014$), den pathologischen Fernmetastasen-Befund (pM-Kategorien) ($p = 0,007$) und die Gruppierung der Karzinome bezüglich der TNM-Kategorien (UICC-Stadien) ($p = 0,002$) ebenfalls signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben (Tab. 26). Gegenüber der Patientengruppe mit positiver Nikotinanamnese zeigte sich ein hochsignifikanter Überlebensvorteil für die Patientengruppe mit negativer Nikotinanamnese ($n < 0,001$) (Abb. 17B, Tab. 26). Nichtraucher hatten eine 5-Jahres-Überlebensrate von 77%. Bei den Rauchern lag diese bei 40% (Abb. 17B). Keine Signifikanz in Bezug auf das OS zeigten folgende klinisch-

pathologische Parameter: histopathologischer Subtyp, histologischer Differenzierungsgrad, Tumorausdehnung (pT-Kategorien), Alkoholanamnese (Tab. 26). Hinsichtlich des PFS ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede in Bezug auf den Fernmetastasen-Befund (pM-Kategorien) ($p = 0,016$) und die Gruppierung der Karzinome bezüglich der TNM-Kategorien ($p = 0,001$; Tab. 27).

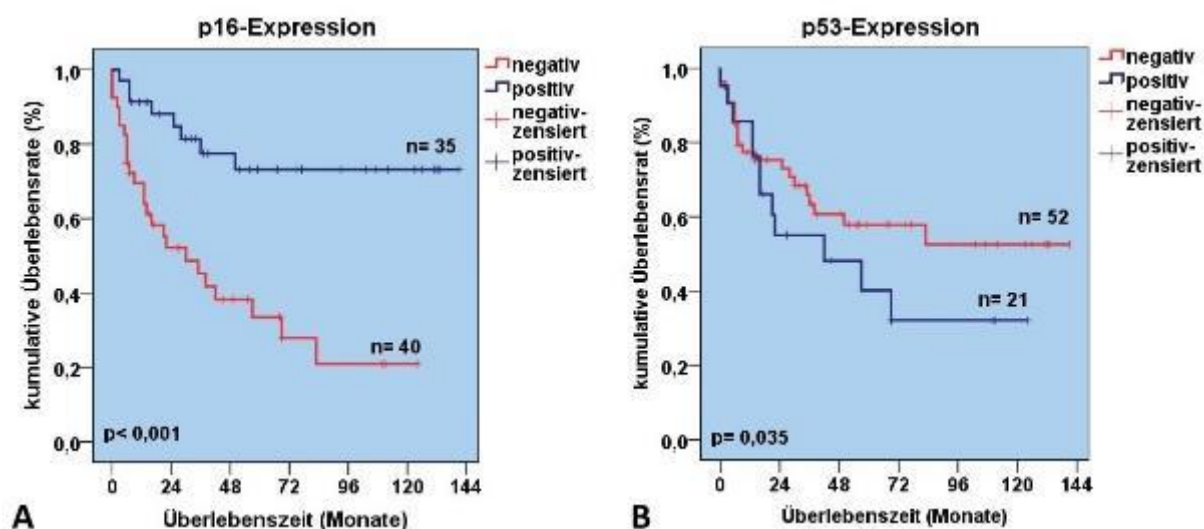


Abb. 16A: OS in Bezug auf die Patientengruppe mit p16^{INK4A}-negativen oder -positiven Karzinomen **Abb. 16B:** OS in Bezug auf die Patientengruppe mit p53-negativen oder -positiven Karzinomen

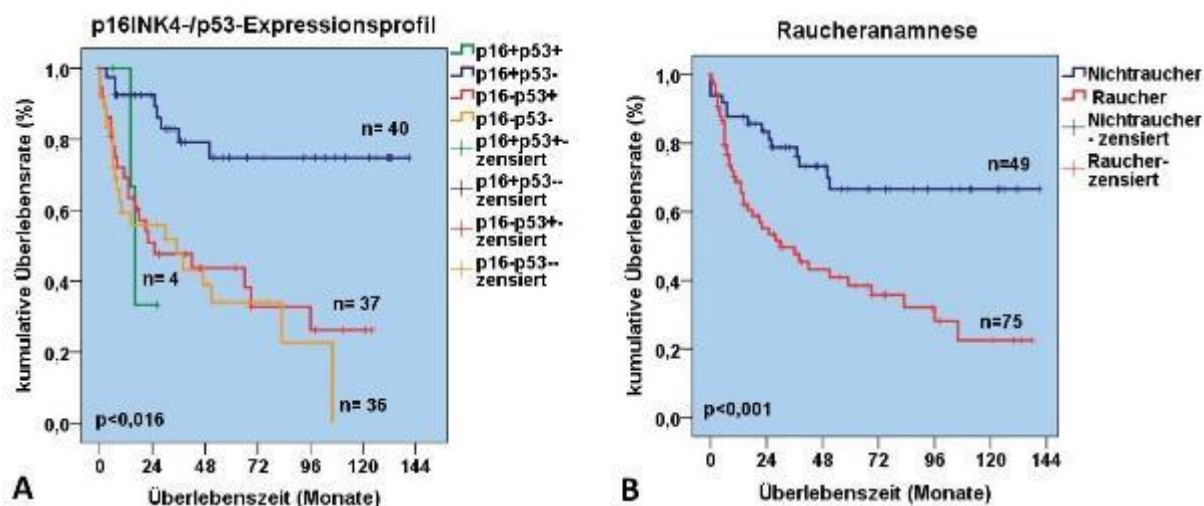


Abb. 17A: OS in Bezug auf das p16^{INK4A}-/p53-Expressionsprofil **17B:** OS in Bezug auf die Nikotinanamnese

4.9.2 MULTIVARIATE ANALYSEN

Der signifikante Überlebensvorteil für die Patientengruppe mit p16^{INK4A}-positiven Karzinomen wurde in der multivariaten Analyse bestätigt ($p = 0,008$). Die Parameter Nikotinanamnese ($p = 0,037$), pathologischer Lymphknotenmetastasen-Befund (pN-Kategorien; $p = 0,016$) und pathologischer

Fernmetastasen-Befund (pM-Kategorien; $p = 0,034$) waren auch hier signifikante Einflussgrößen für das OS im gesamten Patientenkollektiv (Tab. 26). In Bezug auf das PFS wurden in den multivariaten Analysen keine signifikanten Werte ermittelt (Tab.27). In den nachfolgenden Tabellen sind die p-Werte, die Hazard-Ratios und das Konfidenzintervalle aller uni- und multivariaten Überlebensanalysen dargestellt (Tab. 26, 27).

Einflussgrößen		OS: Univariate Analyse		OS: Multivariate Analyse		
Parameter	p-Wert	HR	95% CI	p-Wert	HR	95%-CI
Subtyp	0,575	0,951	0,798- 1,1336	/	/	/
G1-G3	0,787	1,068	0,663- 1,719	/	/	/
pT-Kategorien	0,985	1,003	0,725- 1,388	/	/	/
pN-Kategorien	0,014	1,419	1,075- 1,875	0,016	1,520	1,081-2,137
pM-Kategorien	0,007	4,008	1,470-10,927	0,034	3,108	1,092-8,850
UICC-Stadien	0,002	1,449	1,145- 1,834	0,48	1,310	0,620-2,769
p16 ^{INK4A} -Expression	0,001	0,264	0,132- 0,526	0,008	0,260	0,097-0,701
p53-Expression	0,039	1,765	1,030- 3,024	0,068	2,218	0,944-5,213
Nikotinanamnese	0,001	2,841	1,546- 5,222	0,037	2,910	1,068-7,925
Alkoholanamnese	0,904	0,967	0,557- 1,677	/	/	/

Tab. 26: Uni- und multivariate Analyse des OS (Abkürzungen: HR – Hazard Ratio, CI – Konfidenzintervall, PFS – Progressionsfreies Überleben; (signifikante Werte sind gelb markiert)

Einflussgrößen		PFS: Univariate Analyse		PFS: Multivariate Analyse		
Parameter	p-Wert	HR	95% CI	p-Wert	HR	95% CI
Subtyp	0,106	0,836	0,672-1,039	/	/	/
G1-G3	0,831	0,942	0,544-1,630	/	/	/
pT-Kategorien	0,715	1,057	0,786-1,421	/	/	/
pN-Kategorien	0,174	1,193	0,925-1,538	/	/	/
pM-Kategorien	0,016	3,825	1,285-11,388	0,052	3,094	0,992-9,651
UICC-Stadien	0,001	1,631	1,221-2,178	0,4	1,305	0,702-2,428
p16 ^{INK4A} - Expression	0,271	0,686	0,351-1,342	/	/	/
p53-Expression	0,172	1,583	0,819-3,062	/	/	/
Nikotinanamnese	0,299	1,395	0,744-2,614	/	/	/
Alkoholanamnese	0,669	1,161	0,586-2,298	/	/	/

Tab. 27: Uni- und multivariate Analyse des PFS (Abkürzungen: HR – Hazard Ratio, CI – Konfidenzintervall, PFS – Progressionsfreies Überleben; (signifikante Werte sind gelb markiert)

V. DISKUSSION

Studien belegen, dass die oropharyngealen Karzinome (OPSCC) in zwei unterschiedliche Tumortypen unterteilt werden können, die sich nicht nur durch ihre spezifischen Pathogenesewege, sondern auch auf klinisch-pathologischer und prognostischer Ebene unterscheiden.^{20,26,55,6}

In der vorliegenden Arbeit wurde ein großes Kollektiv von Karzinomen der Gaumenmandel mit Hilfe des Tissue-Microarray(TMA)-Verfahrens immunhistochemisch untersucht. Aufgrund der Vielzahl an klinisch-pathologischen Daten konnte auch eine statistische Analyse durchgeführt werden. Bislang existieren nur wenige Studien, die anhand eines größeren Oropharynxkarzinom-Kollektivs einen immunhistochemischen Vergleich vorgenommen und die klinisch-pathologische und prognostische Relevanz untersucht haben.⁷²⁻⁷⁴ Jedoch wurden in den meisten Studien HPV-assoziierte Karzinome des Oropharynx untersucht.^{75,76,50,21,77-80,24} In der klinischen Routine gilt die immunhistochemische Untersuchung als etablierte Methode zur pathologischen Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen (PEC) des Kopf-Hals-Bereichs.³⁹

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Welche Parameter könnten die Expressionsergebnisse beeinflusst haben?
2. Wie sind die Fälle zu bewerten, die eine positive Expression für beide Antikörper aufweisen?
3. Lassen sich bei den Tonsillenkarzinomen zwei unterschiedliche Tumortypen identifizieren, die sich auf klinisch-pathologischer und prognostischer Ebene voneinander unterscheiden?

5.1 DIE ROLLE DES P16^{INK4A} UND P53

In der Literatur werden zwei verschiedene molekulare Pathogenesewege beschrieben, die zur Entstehung von malignen Entartungen des Oropharynx führen.^{36,20} Die Mutation des Tumorsuppressorgens TP53 ist einer der häufigsten Gründe für eine Karzinomentstehung.^{36,81} Sie führt zu einer Deregulation der Zellzyklus-Kontrolle und verhindert dadurch die physiologische Apoptose von defekten Zellen.^{22,36} Durch die TP53-Mutation kommt es zur Akkumulation des p53-Proteins, da es einem verlängerten Abbau unterliegt.^{22,36} Dieser Mechanismus wird im immunhistochemischen Nachweis durch eine positive Antikörperfärbung gegen das p53-Protein angezeigt.^{22,36} Jedoch wird ebenfalls beschrieben, dass eine Überexpression des p53-Proteins auch durch die Bindung eines nicht mutierten p53-Wildtyp-Proteins an unbekannte biomolekulare Strukturen auftreten kann.⁸¹ Weitere Studien konnten zeigen, dass in einigen Fällen durch die Mutation des TP53-Gens keine Synthese des p53-Proteins mehr stattfindet und dieses dadurch auch nicht immunhistochemisch nachgewiesen werden kann.^{82,81} Mittels IHC-Nachweis kann eine Akkumulation des p53-Proteins ermittelt werden, die in den meisten Fällen durch eine Mutation bedingt ist.⁸¹ Jedoch lässt sich die Mutation nur mit Hilfe einer DNA-Analyse eindeutig erfassen.⁸¹

Wie zuvor erwähnt, kann die Entstehung von Zervixkarzinomen auf eine Infektion mit einem „high risk“ HPV zurückgeführt werden.^{22,5} Auf molekularer Ebene führt dies zu einer Überexpression des Proteins p16^{INK4A}.^{19,37} Ebenso wurde bestätigt, dass auch die Entstehung einiger oropharyngealen PEC und in besonderem Maße die TCa mit dem „high risk“ HPV-Virus-Typ16 in Verbindung stehen.^{9,2} Der Pathogeneseweg dieses Subtyps wurde in vielen Studien dargelegt.^{20,50,27,37} Es ist bekannt, dass die viralen Onkogene E6 und E7 eine entscheidende Rolle bei der Deregulation der Zellzyklus-Kontrolle spielen.^{37,36,83} Unter anderem hemmen sie funktionell das p53- und das Retinoblastomprotein (Rb-Protein).^{36,26} Dies führt zur unkontrollierten Vermehrung von abnormalen Zellen, die jedoch nicht auf einer Mutation von Genen beruht.^{36,26} Infolgedessen kommt es zu einer Akkumulation des funktionell degradierten p53-Wildtyp-Proteins, das jedoch durch seinen schnellen Abbau nicht durch die IHC nachweisbar ist.³⁶ Das virale Onkogen E7 verursacht eine Spaltung des Rb-E2F-Komplexes, indem es an das Rb-Protein bindet.²⁶ In der Folge kommt es zu einer unkontrollierten Zellvermehrung.²⁶ Der Rb-E2F-Komplex ist wiederum für eine negative Feedbackhemmung des Tumorsuppressorgens TP16 zuständig.²⁶ Der Ausfall dieses Mechanismus führt zur Akkumulation des p16^{INK4A}-Proteins, das jedoch funktionell inaktiv ist.^{26,22} Im IHC-Nachweis wird durch die Überexpression des p16^{INK4A}-Proteins eine positive Antikörperfärbung angezeigt.^{22,26} In diesem Zusammenhang bezeichneten einige Autoren p16^{INK4A} als Surrogatmarker für eine „high risk“ HPV-Infektion.^{9,31} Jedoch kann in seltenen Fällen auch eine Mutation des TP16-Gens zu einer p16^{INK4A}-Überexpression führen.⁸⁴

Der Literatur zufolge besteht eine inverse Korrelation zwischen HPV-assoziierten Karzinomen und einer p53-Expression.^{85,2,21} Jedoch berichteten weitere Studien, dass auch HPV-assoziierte Karzinome im IHC-Nachweis eine p53-Expression aufweisen können.^{86,87} Daraus schlussfolgerten einzelne Autoren, dass möglicherweise beide Pathogenesewege miteinander kooperieren.^{86,87} Auch in der vorliegenden Studie wurde eine doppelt positive Expression für Antikörper gegen p53 und p16^{INK4A} ermittelt. Weitere Studien ermittelten ebenfalls eine p53-Expression bei HPV-assoziierten Karzinomen.^{2,88} Jedoch wurden bei der anschließenden DNA-Analyse keine disruptiven Mutationen bei HPV-positiven Karzinomen ermittelt.^{2,88} Die p53-Expression wurde damit begründet, dass es weitere Mechanismen gibt, die zu einem verzögerten Abbau des p53 führen.²

5.2 METHODIK-DISKUSSION

Die TMA ist eine geeignete Methode, um ein großes Gewebekollektiv zeitgleich und unter gleichen Bedingungen untersuchen zu können.^{65,66} Es handelt sich um ein kostengünstiges und gewebesparendes Verfahren, das verschiedene biomolekulare Marker am gleichen Gewebekollektiv auf ihre Validität prüft.^{65,66} Die Identifizierung der einzelnen Gewebeproben in einem TMA-Block erfordert höchste Präzision und wird mittels einer Konstruktionsplanung erreicht, die die Lokalisation der einzelnen Fälle im TMA-Block erfasst.⁶⁵ Auch die Auswertung der TMA-Präparate muss mit höchster Genauigkeit erfolgen, da jede Stanze die gleiche Form besitzt und es zu Fehlinterpretationen kommen kann, z. B. durch Verrutschen des Präparats beim Mikroskopieren. Ein Defizit der TMA-Technik ist, dass nur ein geringer Teil des entnommenen Gewebes untersucht und erfasst wird.⁶⁶ Dies könnte z. B. bei heterogenen Tumoren das Ergebnis verfälschen.^{66,67} Diese Fehlerquelle kann jedoch durch die Erhöhung der Stanzzahl pro Fall weitgehend minimiert werden.^{67,65,66} Da die Gewebeproben hinsichtlich Größe und Form vergleichbar sind, wird im Gegensatz zu konventionellen Schnittpräparaten eine subjektive Fehlbewertung durch die Betrachtung von unterschiedlich großen Gewebeproben vermieden.^{66,67}

Die immunhistochemische Färbemethode ist ein automatisiertes und standardisiertes Verfahren, welches in der histopathologischen Routinediagnostik verwendet wird.^{89,90} Die Fehlerquote ist gering, da die Färbeautomaten optimal gewartet sind und positive und negative Kontrollpräparate pro Färbereihe mitgeführt werden.^{90,89} Vielmehr sind die Ergebnisse vom Zustand des Gewebes, dem verwendeten Antikörper und den IHC-Bewertungskriterien abhängig.⁹¹ Nachteilig wirkt sich aus, dass das Gewebe durch die Parafineinbettung, die Formalinfixierung und auch durch eine ungeeignete Lagerung der Gewebelöcke möglicherweise unzureichend erhalten bleibt und somit nicht untersucht werden kann bzw. zu falsch negativen Ergebnissen führt.^{70,91} Des Weiteren kann die Sensitivität der Antikörperklone von verschiedenen Firmen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen und somit den retrospektiven

Vergleich von Studien erschweren.⁸⁹ Ein weiteres Problem liegt in der Auswertung und dem Vergleich von Färbeergebnissen anderer Studien, da jeder Pathologe subjektiv beurteilt und zum Teil andere Bewertungskriterien verwendet.^{89,66}

Die Detektion der HPV-DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine häufig angewandte Methode, um eine HPV-Infektion zu diagnostizieren, sie ist jedoch nicht standardisiert.^{22,31} Die verschiedenen PCR- und Hybridisierungsverfahren weisen eine unterschiedliche Sensitivität und Spezifität auf, dies erschwert einen Vergleich der Ergebnisse von einzelnen Studien mit unterschiedlichen Verfahren.²² Durch die hohe Sensitivität der PCR muss bei der Durchführung der HPV-Analyse darauf geachtet werden, dass die Reaktionsgefäße und Pipetten steril sind, um einer möglichen Kontamination und damit falsch positiven Ergebnissen vorzubeugen.⁹² Als Vorteil dieser Methode gilt, dass sich damit unterschiedliche HPV-Subtypen ermitteln lassen.³¹ Nachteilig ist, dass eine bestimmte HPV-DNA-Basenlänge in einer Gewebeprobe vorhanden sein muss, um diese amplifizieren zu können.⁹³ Jedoch ist die Qualität der Virus-DNA in den Gewebeproben durch die Vorbehandlung und die Langzeitarchivierung häufig unzureichend und eine Amplifizierung nur bedingt möglich.^{4,94}

5.3 ERGEBNIS-DISKUSSION

Mit Hilfe der TMA wurde bei 169 Primärtumoren und 27 Lymphknotenmetastasen eine immunhistochemische Färbung für Antikörper gegen p16^{INK4A} und p53 durchgeführt. Von 169 Fällen konnten 166 (98,2%) mikroskopisch ausgewertet werden. Mit 34% (p16^{INK4A}/n = 56) und 37% (p53/n = 62) wurde eine annähernd gleich starke Expression für beide Antikörper ermittelt (Tab. 18). Bei der anschließenden HPV-Analyse, die bei doppelt positiver Expression durchgeführt wurde, wiesen 5 von 7 Fällen eine HPV-Assoziation auf (Typ 16, 33) (Tab. 19). Im Gegensatz zu den p53-Färbeergebnissen wurde beim Vergleich der p16^{INK4A}-Färbeergebnisse von den Primärtumoren und deren Lymphknotenmetastasen eine identische Expression ermittelt (Abb. 11). Die Korrelationsanalysen ergaben eine inverse Korrelation zwischen p16^{INK4A}-positiven Karzinomen und einer positiven Nikotinanamnese ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu wies die Patientengruppe mit p53-positiven Karzinomen signifikant häufiger eine positive Nikotinanamnese auf ($p = 0,001$). In Bezug auf das Gesamtüberleben wurde ein signifikanter Überlebensvorteil für die Patientengruppe mit p16^{INK4A}-positiven Karzinomen gegenüber der Patientengruppe mit p16^{INK4A}-negativen Karzinomen sowie der Patientengruppe mit p53-positiven Tumoren ermittelt ($p = 0,008$).

Welche Relevanz diese Ergebnisse in Bezug auf die Charakterisierung der Tonsillenkzinome haben, gilt es zu diskutieren.

5.3.1 GRÜNDE FÜR DIE GERINGEREN EXPRESSIONSRATEN IM VERGLEICH ZUR LITERATUR

In diesem Abschnitt wurden die möglichen Gründe für die geringen Expressionsraten (ExpR) dieser Arbeit im Vergleich zur Literatur untersucht. Diesbezüglich wurden die Größe des Kollektivs, die IHC Bewertungskriterien und die verwendeten Antikörper miteinander verglichen (Tab. 28). In dieser Arbeit zeigten 33,7% (n = 56) der Gewebeproben eine p16^{INK4A}-Positivität (Tab. 18). Eine positive p53-Expression wurde bei 37,2% (n = 62) der Fälle ermittelt (Tab. 18).

In den meisten Publikationen, die sich ausschließlich mit TCa befasst haben, lag die p16^{INK4A}-ExpR bei über 50%.^{95–98,38,2,99,78,39,76,100,101} Die höchste ExpR wurde mit 91% in der Studie von El-Mofty festgestellt.⁹⁹ Studien, die Karzinome des gesamten oropharyngealen Bereichs untersucht haben, wiesen ebenfalls eine p16^{INK4A}-ExpR von über 50% aus.^{33,102–105,72,75} Nur wenige Studien ermittelten eine geringere ExpR als in der vorliegenden Arbeit (Tab. 28).^{49,21,106} In den meisten Studien, die eine p16^{INK4A}-ExpR von über 60% angaben, war ein kleineres Kollektiv (< 100) als in der vorliegenden Arbeit untersucht worden.^{33,102,103,99,38,2,95,96,105,98,97,75} Im Gegensatz dazu lag die p16^{INK4A}-ExpR der Studien, die ein größeres Gewebekollektiv (> 100) umfassten, zwischen 31% und 59% und näherte sich den Werten dieser Studie (Tab. 28).^{107,23,72,106} Jedoch wurde in der Studie von Al-Swiahb et al., dessen Kollektiv 247 Fälle umfasste, mit 13% die geringste Rate ermittelt.²¹

Beim Vergleich der Bewertungskriterien in der Literatur fällt auf, dass in Studien, die eine Zytoplasma- und Kernfärbung von mehr als 1% als positiv definierten, eine überaus hohe p16^{INK4A}-ExpR ermittelt wurde.^{103,99,96} So betrug die p16^{INK4A}-ExpR in der Studie von Lewis et al. 78% (Tab. 28).¹⁰⁴ Im Vergleich dazu wurde bei Al-Swiahb et al. ein strengerer Bewertungsmaßstab gewählt.²¹ Hier mussten mehr als 60% der Tumorzellen eine Kernfärbung anzeigen, um als p16^{INK4A}-positiv gewertet zu werden.²¹ Dementsprechend lag auch die p16^{INK4A}-ExpR nur bei 13%.²¹ Wiederum konnte beim Vergleich mit weiteren Studien, die denselben Bewertungsmaßstab oder strengere Bewertungskriterien angewandt haben, eine deutlich höhere p16^{INK4A}-ExpR als in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden.^{105,102,2,72,76,95}

In der Studie von Park et al. wurde der Antikörperklon desselben Herstellers verwendet, jedoch lag die p16^{INK4A}-ExpR mit 80% weit über dem Wert in dieser Arbeit (Tab. 28).⁹⁷ Des Weiteren lag bei Studien, die das TMA-Verfahren angewandt haben, die p16^{INK4A}-ExpR ebenfalls höher als in dieser Arbeit (Tab. 28).^{33,107,108,97,98}

Auch die p53-ExpR war in der Literatur mit über 50% deutlich höher als in dieser Untersuchung (37%).^{21,99,100,109,2,78} Offenbar spielt die Größe des Patientenkollektivs in Bezug auf die unterschiedlichen ExpR nur eine untergeordnete Rolle.^{80,21,100,102,107} In den Studien von Broglie et al. und Carpenter et al.

wurden Kollektive unterschiedlicher Größe untersucht, jedoch wiesen beide mit 31% die gleiche p53-ExpR auf (Tab. 28).^{107,102} Der Großteil der Studien hatte ein strengeres Bewertungsschema für eine p53-Positivität verwendet.^{21,33,107,102,103,78,2,95,98} Trotzdem lag die p53-ExpR weit über der Rate dieser Arbeit.^{80,109,100,75,21,33,107,102,103,78,2,95,98} In einigen Studien wurde der Antikörperklon DO7 des Herstellers Dako verwendet, welcher auch in dieser Studie zum Einsatz kam (Tab. 28).^{78,2,109,100,79,96} Die unterschiedlichen ExpR scheinen ebenfalls nicht von den verwendeten Antikörperklonen abhängig zu sein.^{21,102,80,103,99,78,2,95,109,100,98}

Insgesamt betrachtet scheinen die Größe des Gewebekollektivs und die unterschiedlichen Bewertungsmaßstäbe nur eine untergeordnete Rolle in Bezug auf die ExpR zu spielen. Sowohl die Antikörperklone der verschiedenen Hersteller als auch die TMA-Technik scheiden als mögliche Ursachen aus. Jedoch könnte eine Mutation des Tumorsuppressorgens TP53, die nicht zur Bildung des mutierten Proteins führt, für die geringeren p53-ExpR in dieser Arbeit bedeutsam sein. Da diese nicht immunhistochemisch erfasst werden.^{82,81} Wie bereits in der Methodik-Diskussion erläutert, scheint jedoch die Qualität des Gewebes ein entscheidender Faktor zu sein, der die ExpR in dieser Arbeit negativ beeinflusst hat.^{91,70} In der nachfolgenden Tabelle sind die Studien aufgeführt, die sich mit der p16^{INK4A}- und p53-Expression von Oropharynx- bzw. TCa befasst haben (Tab. 28).

Referenz	Anzahl der Fälle	PEC-Lokalisation	Fallzahl (%) p16 ^{INK4A} positiv	Fallzahl (%) p53 positiv	IHC-Bewertung p16 ^{INK4A} + p53	p16 ^{INK4A} - + p53-Antikörperklone / Vertrieb
Al-Swiahb et al. ²¹	274	OPSCC	36 (13%)	187 (68%)	p16 > 60% Kernfärbung p53 > 50% Kernfärbung	p16: Klon 16P04 (Neomarkers, Fremont) p53: Neomarkers (Fremont, California)
Begum et al. ³³	45	OPSCC	28 (62%)	/	> 25% Kernfärbung	p16: Klon E6h4 (MTM Heidelberg, Germany)
Broglie et al. ¹⁰⁷	124	OPSCC	54 (44%)	39 (31%)	p16 + p53 > 25% Kernfärbung	nicht angegeben
Carpenter et al. ¹⁰²	16	OPSCC	14 (88%)	5 (31%)	p16 > 50% Kernfärbung p53 > 25% Kernfärbung	p16: Klon E6h4 (MTM Heidelberg, Germany) p53: (Ventana Medical Systems)
Charfi et al. ⁸⁰	52	OPSCC	25 (48%)	24 (46%)	p16 > 5% Kern- + Zytoplasma-Färbung p53 > 10% Kernfärbung	p16: Klon E6H4; (Dako A/S, Glostrup, Denmark) p53: Klon D07 (Dako A/S, Glostrup, Denmark)
Chernock et al. ¹¹⁰	12	OPSCC	8 (67%)	2 (17%)	p16: Kern- + Zytoplasma-Färbung (ja/nein) p53 > 25% Kernfärbung	p16: (Novocastra Labs Ltd., UK) p53: Santa Cruz, CA
El-Mofty et al. ⁹⁹	11	TCa	10 (91%)	6 (55%)	p16 Kern- + Zytoplasma-Färbung (ja/nein) p53 < 25% (+) 25-50% (++) 50-75% (+++) > 75% (++++)	p16: (Novocastra Labs Ltd., UK) p53: Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA
Evans et al. ³⁸	30	TCa	22 (73%)	/	p16 > 30% Kern- + Zytoplasma-Färbung	p16:Klon JC8 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)
Fischer et al. ¹⁰⁸	85	OPSCC	35 (41%)	/	p16 > 5% Kern- + Zytoplasma-Färbung	p16: Klon E6h4 (MTM Heidelberg, Germany)
Friedland et al. ⁷⁸	20	TCa	9 (45%)	10 (50%)	p16 + p53 > 50% Kernfärbung	p16: (Santa Cruz (JCB)) p53: Klon D07 (Dako A/S, Glostrup, Denmark)
Geißler et al. ⁴⁹	45	OPSCC	13 (29%)	/	p16 stark (+++), moderat(++), schwach (+)	p16: Klon E6h4 (MTM Heidelberg, Germany)
Hafkamp et al. ²	16	TCa	10 (63%)	12 (75%)	p16 + p53 > 30% Kernfärbung	p16: Klon E6H4; (Dako A/S, Glostrup, Denmark) p53: Klon D07 (Dako A/S, Glostrup, Denmark)
Hoffmann et al. ⁵⁰	39	TCa	12 (31%)	/	p16 < 5% (+) < 25% (++) > 25% Kern- + Zytoplasma-Färbung	p16: Klon E6h4 (MTM Heidelberg, Germany)
Kim et al. ⁹⁵	33	TCa	27 (82%)	/	p16 > 60% Kern- + Zytoplasma-Färbung p53 > 50% Kernfärbung	p16: Klon E6h4 (MTM Heidelberg, Germany) p53: (MTM Heidelberg, Germany)

Klussmann et al.³⁹	34	TCa	19 (56 %)	/	p16 > 25% Kern- + Zytoplasma-Färbung	p16: 16P04,16P07 (Neomarkers, Fremont, CA)
Kumar et al.¹⁰⁹	42	OPSCC	/	31 (74%)	p53 > 10% Kernfärbung	p53: DO7 (Dako, Carpinteria, CA)
Kuo et al.⁷⁶	92	TCa	49 (53%)	/	p16 > 50% Kernfärbung (Zytoplasma)	p16: Klon JC8 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)
Lewis et al.¹⁰⁴	239	OPSCC	187 (78%)	/	p16 > 1% Kernfärbung	p16: Klon E6h4 (MTM Heidelberg, Germany)
Li et al.⁷⁹	86	TCa	35 (41%)	58 (67%)	p16 > 5% Kern- + Zytoplasma-Färbung p53 > 10% Kernfärbung	p16: Klon 16P04 (Neomarkers, Fremont, CA) p53: DO7 (Dako, Carpinteria, CA)
Li et al.⁹⁶	49	TCa	31 (63%)	31 (63%)	p16: Kernfärbung (ja/nein) p53 > 10% Kernfärbung	p16: Klon 16P04 (Neomarkers, Fremont, CA) p53:Klon DO7(Dako)
Li et al.³⁰	50	TCa	25(54%)	34 (68%)	p16 > 5% Kern- + Zytoplasma-Färbung p53 > 10% Kernfärbung	p16: Klon 16P04 (Neomarkers, Fremont, CA) p53: DO7 (Dako, Carpinteria, CA)
Maier et al.²³	102	OPSCC	39 (38%)	/	nicht angegeben	p16: Klon E6H4 (MTM Laboratories AG, Heidelberg)
Melkane et al.¹⁰⁵	46	OPSCC	28 (61%)	/	p16 > 10% Kern- + Zytoplasma-Färbung	p16: Klon E6h4 (MTM Heidelberg, Germany)
Oguejiofor et al.⁷²	217	OPSCC	129 (59%)	/	p16 > 70% Kern- + Zytoplasma-Färbung	p16: Klon E6h4 (MTM Heidelberg, Germany)
Park et al.⁹⁷	79	TCa	63 (80%)	/	nicht bekannt	p16: Klon G175-405 (BD PharmingenTM)
Ryu et al.⁹⁸	42	TCa	33 (79%)	6 (14%)	p16 > 20% Kern- + Zytoplasma-Färbung p53+ > 20% Kernfärbung	p16: Klon P2D11F11 (Novocastra, Buffalo Grove, IL) p53: Bp53-11 (Ventana, Tuscan)
Smith et al.⁷⁵	68	OPSCC	46(68%)	32 (47%)	p16 + p53 > 10% Kernfärbung	nicht angegeben
Wittekindt et al.¹⁰¹	34	TCa	16 (47%)	/	p16 > 25% Kern- + Zytoplasma-Färbung	p16: Klon 16P04,16P07 (Neomarkers, Fremont, CA)
Mooren et al.¹⁰⁶	162	OPSCC	50 (31%)	/	p16 > 70% Kern- + Zytoplasma-Färbung	p16: Klon E6H4 (Roche, Almere, The Netherland)
meine Studie	169	TCa	58 (34%)	62 (37%)	P16 + p53 > 10% Kern- und Zytoplasma-Färbung	p16: Klon G175-405 (BD Pharmingen™): p53: Klon DO-7 (Dako Germany GmbH)

Tab. 28: Die Tabelle zeigt die Studien, die sich mit der p16^{INK4A}- und p53-Färbung befasst haben (Abkürzungen: OPSCC – Plattenepithelkarzinom des Oropharynx, TCa-Plattenepithelkarzinom der Tonsilla palatina).

5.3.2 ABHÄNGIGKEIT DER EXPRESSION VON RISIKOFAKTOREN

Studien weisen darauf hin, dass die p16^{INK4A}- und p53-Expression in Verbindung mit spezifischen Risikofaktoren steht.^{21,20,25,107}

In den Studien von Ryu et al. und Chernock et al. waren mehr als 50% der Karzinome p16-positiv.^{98,103} Eine p53-Positivität lag bei weniger als 20% der Karzinome vor (Tab. 28).^{98,103} In beiden Untersuchungen wiesen über 50% der Patienten HPV-assoziierte Karzinome auf.^{98,103} Weitere Literaturangaben belegen ebenfalls die signifikante Korrelation zwischen einer p16^{INK4A}-Expression bei HPV-assoziierten Tumoren.^{21,111,112,49} Al-Swiahb et al. ermittelten eine geringe ExpR für p16^{INK4A} und eine hohe p53-Rate.²¹ Dementsprechend konsumierte die Mehrheit des Patientenkollektivs Nikotin (79%), und nur ein geringer Teil der Karzinome war mit HPV-assoziiert (12%).²¹ Hoffmann et al. fanden heraus, dass es Mechanismen gibt, die den HPV-Status beeinflussen.¹¹³ Demnach wird bei Nikotinkonsumenten vermehrt ein bestimmtes Schutzprotein in den Schleimhautzellen der Atem- und Speisewege gebildet, welches die Bindung der viralen Onkogene verhindert.¹¹³ Somit können die Zellen nicht mit HPV infiziert werden.¹¹³ Der genaue Mechanismus ist noch Gegenstand derzeit laufender Studien.¹¹³ Diese Beobachtung würde für die Abhängigkeit der Expression von spezifischen Risikofaktoren sprechen.^{21,103} In dieser Arbeit lag trotz der hohen Anzahl an Rauchern (62%) die p53-ExpR bei geringen 37% (Tab. 18).

5.3.3 SIMULTANE P16^{INK4A}- UND P53-POSITIVITÄT

In der vorliegenden Arbeit waren 14 (8,4%) Fälle simultane positiv für p16^{INK4A} und p53. Die gleichzeitige Expression beider Antikörper wurde auch in einigen Publikationen festgestellt (Tab.29).^{99,95} In dieser Arbeit konnte in 7 Fällen mit auswertbarer DNA eine HPV-Analyse durchgeführt werden. Davon waren 5 Fälle HPV-positiv. Vier Proben wurden dem Subtyp 16 und eine den Subtypen 16 und 33 zugeordnet. In der Studie von El-Mofty et al. wiesen alle Fälle, die eine simultane Positivität für p16^{INK4A} und p53 zeigten, eine HPV-Assoziation auf.⁹⁹ Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die Studie von El-Mofty et al. weisen darauf hin, dass bei einer simultanen Positivität für beide Antikörper mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eine HPV-Assoziation besteht.⁹⁹ Somit stützt das Ergebnis dieser Studie die Hypothese einer möglichen Koexistenz beider Pathogenesewege.^{86,87} Jedoch zeigt der IHC-Nachweis eine Akkumulation des p53-Proteins an, das in den meisten Fällen durch eine Mutation bedingt ist.⁸¹ Ob tatsächlich eine Mutation besteht, kann nur mit Hilfe einer DNA-Analyse eindeutig erfasst werden.^{81,2} Eine eindeutige Aussage lässt sich hierzu derzeit jedoch nicht treffen, da auch der Wissenschaft noch unbekannte Faktoren eine Rolle spielen könnten. In der nachfolgenden Tabelle sind Studien aufgeführt, die sich mit den p16^{INK4A}- und p53-Expression und dem HPV-Status befasst haben (Tab.29).

Referenz	Anzahl der Fälle	HPV-Status positiv (%)	Fallzahl (%) p16 ^{INK4A} -positiv	Fallzahl (%) p53 positiv	Fallzahl (%) simultane Expression (p16 ^{INK4A} + p53)
Al-Swiahb et al. ²¹	274	33 (12%)	36 (13%)	187 (68%)	nicht angegeben
Carpenter et al. ¹⁰²	16	14 (88%)	14 (88%)	5 (31%)	3 (19%)
Charfi et al. ⁸⁰	52	32 (62%)	25 (48%)	24 (46%)	nicht angegeben
Chernock et al. ¹¹⁰	12	9 (75%)	8 (67%)	2 (17%)	nicht angegeben
El-Mofty et al. ⁹⁹	11	10 (91%)	10 (91%)	6 (55%)	5 (46%)
Evans et al. ³⁸	30	22 (88%)	22 (73%)	/	/
Friedland et al. ⁷⁸	20	19 (95%)	9 (45%)	10 (50%)	nicht angegeben
Geißler et al. ⁴⁹	45	14 (31%)	13 (29%)	/	/
Hafkamp et al. ²	16	10 (63%)	10 (63%)	12 (75%)	7 (44%)
Hoffmann et al. ⁵⁰	39	12 (31%)	12 (31%)	/	nicht angegeben
Kim et al. ⁹⁵	33	15 (46%)	27 (82%)	8 (24%)	5 (15%)
Kluschmann et al. ³⁹	34	18 (53%)	19 (56 %)	/	/
Kumar et al. ¹⁰⁹	42	13 (31%)	/	31 (74%)	/
Kuo et al. ⁷⁶	92	40 (44%)	49 (53%)	/	/
Lewis et al. ¹⁰⁴	239	139 (58%)	187 (78%)	/	/
Li et al. ⁹⁶	49	9 (18%)	31 (63%)	/	/
Li et al. ³⁰	50	21 (42%)	25(54%)	34 (68%)	nicht angegeben
Park et al. ⁹⁷	79	54 (68%)	63 (80%)	/	/
Wittekindt et al. ¹⁰¹	34	18 (53%)	16 (47%)	/	/
Mooren et al. ¹⁰⁶	162	51 (31%)	50 (31%)	/	/

Tab. 29: Studien zur Relation des HPV-Status mit dem IHC-Nachweis von p16^{INK4A} und p53

5.3.4 PRIMÄRTUMOR UND LYMPHKNOTENMETASTASE

Der Literatur zufolge ist bei 3-9% der Kopf-Hals-Karzinome mit Lymphknotenbefall klinisch sowie radiologisch kein Primärtumor auffindbar.^{83,31,94} Die klinische Diagnose für diese Situation lautet „CUP-Syndrom“, welche für „Cancer of Unknown Primary“ (CUP) steht.⁸³ In Hinblick auf den möglichen Ursprungsort eines CUP befassen sich viele Studien mit der Untersuchung der Lymphknotenmetastasen.^{31,83,114} In der vorliegenden Studie konnten 26 TCa und deren Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch verglichen werden. Im Gegensatz zu den p53-Färbeergebnissen wurde dabei eine identische Expression ermittelt (Abb. 11, 12A,B).

Begum et al. ermittelten eine signifikante Übereinstimmung zwischen dem Herkunftsort des Primärtumors und der p16^{INK4A}-Expression ($p > 0,001$).³¹ Demzufolge trat eine p16^{INK4A}-Überexpression nur bei Lymphknotenmetastasen aus dem oropharyngealen Bereich auf.³¹ Weitere Publikationen bestätigten

dieses Ergebnis.^{31,115,94} Der Literatur zufolge bestand außerdem eine signifikante Übereinstimmung zwischen HPV-assoziierten Lymphknotenmetastasen und einer p16^{INK4A}-Positivität.³¹ Demnach waren in der Studie von Begum et al. 77% der HPV-assoziierte Lymphknotenmetastasen positiv für p16^{INK4A}.³¹ Im Gegensatz dazu traf dies nur für 3% der HPV-negativen Lymphknotenmetastasen zu ($p > 0,001$).³¹ Außerdem bestätigen Studien, dass klinisch okkulte Karzinome der Gaumenmandel und des Zungengrundes oftmals mit HPV-positiven Lymphknotenmetastasen assoziiert sind.^{83,22} Als Ursache wird der spezifische Aufbau des Kryptenepithels der Tonsilla palatina und lingualis genannt, welches empfänglicher für eine HPV-Infektion zu sein scheint; hier kann der HPV leichter mit den teilungsfähigen Basalzellen in Kontakt treten.⁸³ Die HPV-Assoziation des Primärtumors und der Lymphknotenmetastase spricht dafür, dass während der Tumorprogression eine klonale Weitergabe des HPV-Genoms stattfindet.⁵ Laut den Angaben in der Literatur sollte bei der Diagnose eines CUP entweder der indirekte immunhistochemische Nachweis für Antikörper gegen p16^{INK4A} oder eine direkte HPV-Analyse veranlasst werden.³¹ In Übereinstimmung mit der Literatur bestätigt die vorliegende Arbeit, dass der immunhistochemische Nachweis für Antikörper gegen p16^{INK4A} ein exzellentes Mittel ist, um bei einem CUP-Syndrom die Lokalisation des Primärtumors einzugrenzen.

5.3.5 KLINISCH-PATHOLOGISCHE PARAMETER

Bezüglich der Geschlechterverteilung des Kollektivs waren wie in der Literatur beschrieben deutlich mehr Männer als Frauen betroffen.^{23,83} Mit über 75% erkrankten häufiger Männer an oropharyngealen Karzinomen.^{102,76,96,72,98,106} In der vorliegenden Arbeit lag ein Geschlechterverhältnis von 5:1 vor. Der Medianwert des Alters von 59 Jahren entspricht den Literaturangaben.^{23,99,102,96,72,106} Zusätzlich belegen Studien, dass Patienten mit einem HPV-assoziierten Tumor häufig jünger sind als Betroffene ohne dieses Merkmal.^{116,117,22} Im Gegensatz zu dieser Beobachtung wiesen in der vorliegenden Arbeit 4 von 5 Patienten mit HPV-positiven Plattenepithelkarzinomen (PEC) ein hohes Alter auf (> 45 Jahre). Laut den Literaturangaben ist das Auftreten von Oropharynxkarzinomen häufig mit einer positiven Nikotinanamnese assoziiert.¹¹⁸ In Übereinstimmung hiermit wies das Patientenkollektiv dieser Arbeit einen hohen Prozentsatz an aktiven Rauchern und Ex-Rauchern auf.^{21,102,80,96,72} Außerdem war der Anteil an Alkoholkonsumenten hoch. Dies deckte sich ebenfalls mit den berichteten Daten in der Literatur.^{21,76,72,98,119} In Bezug auf die Tumorausdehnung (T-Kategorien) wurden in der Literatur am häufigsten die T1/T2 -Kategorien diagnostiziert, dies stimmte weitestgehend mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein.^{102,80,100,105,72} Ebenso entsprach der positive Lymphknotenmetastasen-Befund mit 88,7% ($n = 134$) weitestgehend den Literaturangaben.^{21,102,2,100,72,98,106} Hinsichtlich dessen war die pN2-Kategorie am häufigsten vertreten.^{102,98,72,106} Das UICC-Stadium IVa lag sowohl in der Literatur als auch

in der vorliegenden Arbeit am häufigsten vor.^{98,72,23,24,21,2} Bezüglich des histologischen Differenzierungsgrads war in dieser Studie der überwiegende Teil der PEC mäßig (47%) bzw. schlecht (49%) differenziert, dies deckt sich ebenfalls mit den Angaben aus der Literatur.^{72,106,100,2} Die Literaturangaben bestätigten in Bezug auf den histopathologischen Subtypen, dass TCa häufig vom nicht bzw. gering verhornenden Typ sind.⁹⁹ Auch die Rezidivrate (37%) lag innerhalb der in Studiendaten angegebenen Werte (19%-44%).^{100,102,95,39} Aufgrund der geringen Anzahl an Studien, die das Auftreten von Fernmetastasen und Residualtumoren angaben, ist diesbezüglich keine Aussage möglich.

Zusammenfassend ist die Mehrheit der Personen, die an oropharyngealen Karzinomen erkranken Nikotinkonsumenten, männliche und in höherem Alter. Der überwiegende Anteil der TCa weist bei Erstdiagnose die T1/T2-Kategorien, einen positiven Lymphknotenmetastasen-Befund und ein höheres UICC-Stadium auf. Histologisch betrachtet sind die PEC der Tonsilla palatina bzw. Oropharynxkarzinome häufig mäßig bis schlecht differenziert und vom nicht bzw. gering verhornenden Typ.

5.3.6 TUMORTYPEN

Es ist bewiesen, dass der Entstehung von Karzinomen ein multifaktorieller Prozess zugrunde liegt und dass die stärksten unabhängigen Risikofaktoren der Tabak- und Alkoholkonsum sind.^{32,59,11} Treten Sie zusammen auf, entstehen synergistische Effekte.^{59,2} In den letzten Jahren wurden jedoch auch PEC des Oropharynx bei Patienten diagnostiziert, die weder Alkohol noch Nikotin konsumierten.^{59,28,24,76,23,32} Diesbezüglich wurde das „high risk“ HPV-Virus-Typ16 als weitere Ursache festgestellt.^{5,80,79,12,78,77,120,117} In der Literatur werden Oropharynx- bzw. TCa in zwei Tumortypen unterteilt, die Nikotin-/Alkohol-assoziierten PEC und die HPV-assoziierten PEC.^{20,25,55,28,26,6} Die entsprechenden klinisch-pathologischen Unterschiede sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (Tab. 30).^{6,20,26,55} Diese Daten werden nachfolgend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verglichen.

Merkmal	HPV-assoziiert	Nikotin-/Alkohol-assoziiert
Alter	< 60 Jahre	> 60 Jahre
Risikofaktoren	Sexualverhalten ?	Nikotin- + Alkoholkonsum
Lokalisation	Tonsilla palatina + -lingualis	unspezifisch, Kopf-Hals-Bereich
Histopathologie	basaloid, nicht-verhornend, schlecht differenziert	verhornend, mäßig differenziert
T-Kategorien	T1/T2-Kategorien + Lymphknotenmetastasierung	variabel
Fernmetastasierung	nicht bekannt	bekannt
TP53-Mutation	selten	häufig
p16-Überexpression	hoch	niedrig
relative Prognose	besser	schlechter
High-Risk-HPV-DNA-Nachweis	meist	gelegentlich

Tab 30: Unterscheidung der oropharyngealen Karzinome in zwei Tumortypen in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Parametern^{6,20,26,55}

5.3.7 KLINISCH-PATHOLOGISCHE UNTERSCHIEDE

In der statistischen Analyse wurden die p16^{INK4A}- und p53-Färbeergebnisse mit den klinisch-pathologischen Parametern korreliert. Es wurden inverse Korrelationen in Bezug auf die p16^{INK4A}-Expression und den histopathologischen Differenzierungsgrad ($p = 0,021$), sowie zwischen einer p16^{INK4A}-Positivität und einer positiven Nikotinanamnese ermittelt ($p < 0,001$). Darüber hinaus ergab sich eine signifikante Korrelation in Bezug auf eine positive p53-Expression und eine positive Nikotinanamnese ($p = 0,001$). Alle weiteren Parameter waren nicht signifikant.

5.3.7.1 TNM- und UICC-Stadien

Die Korrelation der Färbeergebnisse mit der Tumorausdehnung (T-Kategorien) ergab sowohl in dieser Arbeit als auch in der Literatur keine Signifikanz.^{39,23,95,108} Jedoch ermittelten Carpenter et al. eine kleinere T-Kategorie bei HPV-assoziierten Karzinomen.¹⁰² In Bezug auf den Lymphknotenmetastasen-Befund wurde in der vorliegenden Studie kein signifikantes Verteilungsmuster ermittelt. Sowohl die p16^{INK4A}-positiven als auch die p16^{INK4A}-negativen Fälle wiesen nahezu gleich häufig Lymphknotenmetastasierungen auf. Eine ähnliche Verteilung zeigte sich bei den p53-positiven und p53-negativen Karzinomen. Dagegen ermittelten Broglie et al. und Kuo et al. eine signifikant häufigere

Lymphknotenmetastasierung bei einer p16^{INK4A}-Expression.^{76,107} Ebenso wurde in der Literatur eine signifikante Korrelation zwischen einem positiven Lymphknotenmetastasen-Befund und einer HPV-Assoziation erfasst.^{21,103,102,39} Bezüglich der Fernmetastasierung wurden, sowohl in dieser Arbeit als auch in den Literaturangaben, keine signifikanten Ergebnisse ermittelt.⁹⁵ Einige Studien gaben an, dass p16^{INK4A}-positive oropharyngeale Tumore einen Trend zu einem fortgeschritteneren UICC-Stadium aufweisen.^{72,76} Dies ließ sich jedoch weder in dieser Arbeit noch in der weiteren Literatur bestätigen.^{95,39}

5.3.7.2 Differenzierungsgrad und Subtyp

Sowohl in der Studie von Oguejiofor et al. als auch in dieser Arbeit wurde eine Signifikanz bei der Korrelation des histopathologischen Differenzierungsgrades mit der p16^{INK4A}-Expression ermittelt.⁷² Die p16^{INK4A}-positiven TCa waren im Gegensatz zu den p16^{INK4A}-negativen TCa signifikant häufiger schlecht differenziert.⁷² Im Gegensatz zur vorliegenden Studie wurde in der Literatur eine Signifikanz in Bezug auf den histopathologischen Subtypen festgestellt.¹⁰⁴ Lewis et al. stellten eine signifikante Assoziation zwischen einer p16^{INK4A}-Expression und dem nicht verhornenden PEC fest.¹⁰⁴ In weiteren Studien wurde festgestellt, dass HPV-assoziierte oropharyngeale Karzinome signifikant häufiger vom nicht bzw. gering verhornendem Typ waren.^{76,99,103}

5.3.7.3 Nikotinanamnese

Die Korrelation der p16^{INK4A}- und der p53-Expressionsergebnisse mit der Nikotinanamnese wurde in der vorliegenden Studie in beiden Fällen als hochsignifikant eingestuft (p16^{INK4A}: $p < 0,001$; p53: $p = 0,001$). Demnach besteht eine inverse Korrelation zwischen einer p16^{INK4A}-Expression und einer positiven Nikotinanamnese. Eine signifikante Korrelation wurde zwischen einer positiven Nikotinanamnese und einer p53-Expression erfasst. In Übereinstimmung mit dieser Arbeit waren in der Studie von Oguejiofor et al. Patienten mit p16^{INK4A}-positiven Karzinomen signifikant häufiger Nichtraucher.⁷² In der Studie von Broglie et al. waren Patienten mit p53-positiven Karzinomen signifikant häufiger Raucher.¹⁰⁷ Darüber hinaus stellten weitere Studien eine Signifikanz hinsichtlich einer HPV-Assoziation und einer negativen Nikotinanamnese fest.^{80,2,76,21}

In der Literatur wurden keine Daten bezüglich der statistischen Korrelation der Färbeergebnisse mit der Alkoholanamnese, der Rezidivrate sowie der Residualtumorraten, der Lymphgefäß-, Venen- und Perineuralscheideninvasion (pL,pV-,pPn-Befund) veröffentlicht.

5.3.8 PROGNOSTISCHE UNTERSCHIEDE

In der Literatur wurde nachgewiesen, dass der immunhistochemische Nachweis von Antikörpern gegen p16^{INK4A} und p53 bei oropharyngealen Karzinomen in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) und das progressionsfreie Überleben (PFS) prognostische Relevanz besitzt.^{121,122} In dieser Arbeit betrugen die 5-Jahres-Überlebensraten 26%. Dieser Wert liegt in der Literatur deutlich höher.^{80,103,98,85} So ermittelten Oguejiofor et al. ein OS von 56%.⁷² Vielerlei Faktoren können das schlechtere OS in dieser Arbeit beeinflusst haben, wie z. B. das höhere Alter der Patienten, die hohe Rate der Nikotinkonsumenten sowie die erhöhte Anzahl an Lymphknotenmetastasierungen.⁵⁹ Bei Oguejiofor et al. lag der Medianwert des Alters bei 49 Jahren.⁷² Im Vergleich dazu war das Alter mit einem Medianwert von 59 Jahren in dieser Studie deutlich höher.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein hochsignifikanter Überlebensvorteil für die Patientengruppe mit einem p16^{INK4A}-positiven Karzinom ermittelt ($p < 0,001$) (Abb. 16A). Dies steht in Einklang mit den meisten Angaben in der Literatur.^{108,50,76,104,110,75,74,123,107} In dieser Studie lag die 5-Jahres-Überlebensrate dieser Patientengruppe bei 72%. Ähnliche Werte wurden in der Studie von Fischer et al. erfasst, hier lag das OS für die Patientengruppe mit p16^{INK4A}-positiven Karzinomen bei 59%, wohingegen für die Patientengruppe mit p16^{INK4A}-negativen Tumoren ein OS von 25% ermittelt wurde.¹⁰⁸ In weiteren Studien wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt.^{123,21,108,107,59} Einige Autoren verglichen diesbezüglich die p16^{INK4A}-Expression mit einem positiven HPV-Status.^{50,72,75,74,106} Sie ermittelten ebenfalls, unabhängig vom HPV-Status, ein besseres OS bei Patienten mit p16^{INK4A}-positiven Tumoren.^{50,72,75,74,106} Dies führte zu Spekulationen, ob eine Überexpression des p16^{INK4A}-Proteins auch durch unbekannte molekulare Mechanismen, unabhängig von einer HPV-Infektion, stattfindet.¹⁰⁴ Jedoch konnten weitere Studien das bessere OS für die Patienten mit p16^{INK4A}-positiven Karzinomen und einem negativen HPV-Status damit begründen, dass die p16^{INK4A}-Überexpression ein frühes Ereignis einer HPV-Infektion darstellt, in dem der positive HPV-Status noch nicht feststellbar ist.^{108,74} Fischer et al. stellten fest, dass das bessere OS ausschließlich bei oropharyngealen Tumoren auftrat.¹⁰⁸ Bei anderen Lokalisationen wie der Mundhöhle ($p = 0,171$), dem Larynx ($p = 0,519$) und dem Hypopharynx ($p = 0,593$) war dies bei Patienten mit p16^{INK4A}-positiven Tumoren nicht der Fall.¹⁰⁸

Patienten mit p16^{INK4A}-positiven Karzinomen hatten im Vergleich zu Patienten mit p53-positiven Karzinomen ein besseres OS. In der Literatur waren p16^{INK4A}-positive Karzinome häufig mit einer HPV-Infektion assoziiert.^{106,50,72,75,74} Die bessere Prognose wurde damit begründet, dass bei einer HPV-Infektion anders als bei einer p53-Mutation keine disruptiven Genmutationen vorliegen, sondern lediglich die Genprodukte von intakten Genen funktionell gehemmt werden. Dementsprechend besitzen sie im Gegensatz zu p53-positiven Karzinomen einen intakten Apoptose-Mechanismus.^{108,76,100,39} In Anbetracht

dessen ist die Hemmung der Genprodukte durch Elimination des Virusgenoms grundsätzlich reversibel, während disruptive Genmutationen irreversibel sind.^{108,76,39}

In der univariaten Analyse konnte ebenfalls ein signifikanter Überlebensvorteil für die Patientengruppe mit p53-negativen TCa ermittelt werden ($p = 0,039$). Die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit p53-negativen Karzinomen lag bei 58% im Vergleich zu 40% bei den Patienten mit p53-positiven Tumoren. In Übereinstimmung mit dieser Arbeit wurde in der Studie von Al-Swiahb et al. für die Patientengruppe mit p53-negativen Karzinomen ein starker Trend für ein besseres OS ermittelt.²¹ Jedoch war der Überlebensvorteil in der multivariaten Analyse sowohl in dieser Arbeit als bei auch Al-Swiahb et al. nicht mehr signifikant.²¹ Im Gegensatz dazu erwies sich die p53-Expression in der Studie von Smith et al. als unabhängiger Faktor.⁷⁵ Smith et al. korrelierten die p53-Expression mit dem HPV-Status.⁷⁵ Die höchste Überlebensrate hatten Patienten mit HPV-positiven und p53-negativen Karzinomen, danach folgte die Gruppe mit HPV-negativen und p53-negativen Tumoren und die Gruppe mit HPV-positiven und p53-positiven Karzinomen.⁷⁵ Die niedrigste Überlebensrate wurde in der Gruppe mit HPV-negativen und p53-positiven Tumoren festgestellt.⁷⁵

Die Nikotinanamnese ($p = 0,037$), der pathologische Lymphknotenmetastasen-Befund ($p = 0,016$) und der pathologische Fernmetastasen-Befund ($p = 0,034$) waren in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) unabhängige Einflussgrößen (Tab. 26). Die Abhängigkeit des Gesamtüberlebens von der Nikotinanamnese ist in der Kaplan-Meier-Kurve grafisch dargestellt (Abb. 17B, Tab. 26). Auch in der Literatur findet sich ein hochsignifikanter Überlebensvorteil bei negativer Nikotinanamnese.^{107,76,85,124,125} Der pathologische Lymphknotenmetastasen-Befund ist nach aktueller Datenlage ebenfalls ein unabhängiger Faktor.^{107,85,124} Im Gegensatz zu dieser Arbeit fand sich in Studien jedoch eine signifikant schlechtere Prognose bei fortgeschrittenem UICC-Stadium.^{79,74,75} In Übereinstimmung mit der Literatur sind die Tumorausdehnung (pT-Kategorien) und die Alkoholanamnese nicht signifikante Einflussgrößen.^{85,107,98} Jedoch wurde in der Studie von Chernock et al. im Gegensatz zu dieser Arbeit ein besseres OS bei der Patientengruppe mit Karzinomen vom nicht verhornendem Typ ermittelt.¹⁰³

Anders als in der vorliegenden Arbeit weist die Literatur ein besseres PFS für die Patientengruppe mit p16^{INK4A}-positiven oropharyngealen Karzinomen aus (Tab.27).^{107,100,72,126,111,123,39,59} Die Stadiengruppierung (UICC-Stadien) und die Tumorausdehnung (T-Kategorie) wurden in der Literatur ebenfalls als nicht signifikant eingestuft.^{107,76} Abweichend von dieser Arbeit ermittelten Broglie et al. für das PFS eine Signifikanz in Bezug auf den Lymphknotenmetastasen-Befund (N-Kategorien).¹⁰⁷

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahrzehnten wurde in Bezug auf die oropharyngealen Tumore, insbesondere der Plattenepithelkarzinome, eine stetige Zunahme der Neuerkrankten beobachtet. Lokalisiert werden diese häufig in der Gaumenmandel. Oft werden Karzinome der Gaumenmandel erst im fortgeschrittenen Tumorstadium festgestellt, da sie lange Zeit keine Symptome verursachen. Als erstes klinisches Zeichen wird häufig eine regionäre Lymphknotenmetastasierung diagnostiziert und in einigen Fällen ist der Primärtumor nicht mehr feststellbar.

Die oropharyngealen Tumore werden in der Literatur in zwei Tumortypen unterteilt, das sind Nikotin-/Alkohol- und mit humanen Papillomviren (HPV) assoziierte Tonsillenkarzinome. Sie unterscheiden sich sowohl aus klinisch-pathologischer als auch aus prognostischer Sicht voneinander. Charakteristisch sind verschiedene Pathogenesewege und unterschiedliche Risikofaktoren. Auf biomolekularer Ebene weisen Nikotin-/Alkohol-assoziierte Tonsillenkarzinomen (TCa) eine Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53 auf, welches eine Akkumulation des p53-Proteins zur Folge hat. Im Gegensatz dazu wurde bei HPV-assoziierten Tonsillenkarzinomen eine p16^{INK4A}-Überexpressionen festgestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Tonsillenkarzinom-Kollektiv aus den Jahren 2000 bis 2013 immunhistochemisch untersucht, mit dem Ziel, dieses klinisch-pathologisch zu charakterisieren. Die Studie ging der Frage nach, ob sich beim TCa zwei unterschiedliche Tumortypen abgrenzen lassen. Mittels der Tissue-Microarray-Technik wurden 169 Gewebeproben von Primärtumoren und 27 Gewebeproben von Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch gegen p16^{INK4A} und p53 gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Bei den Gewebeproben, die eine positive Färbung für beide Antikörper zeigten, erfolgte eine HPV-Analyse. Außerdem wurden die Färbeergebnisse der Primärtumore und deren Lymphknotenmetastasen verglichen. Abschließend erfolgten eine statistische Korrelation der Färbeergebnisse mit den klinisch-pathologischen Daten und eine Überlebensanalyse.

166 (98,2%) Gewebeproben von Primärtumoren konnten lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Davon exprimierten 56 (34%) p16 und 62 (37%) p53. Beim Vergleich der p16^{INK4A}- und p53-Färbeergebnisse je Fall zeigte sich bei 14 (8,4%) Proben eine simultane Färbung für beide Antikörper. In 7 Fällen mit auswertbarer DNA konnte eine HPV-Analyse durchgeführt werden. Davon wurden fünf Fälle positiv auf HPV (Typ 16, 33) getestet. Im Gegensatz zu den p53-Färbeergebnissen zeigte sich beim Vergleich der p16^{INK4A}-Färbeergebnisse für die Primärtumore und deren Lymphknotenmetastasen eine identische Expression.

Die Korrelationsanalyse zwischen den klinisch-pathologischen Parametern und den Färbeergebnissen ermittelte signifikante Ergebnisse in Bezug auf die Nikotinanamnese. Nichtraucher wiesen signifikant

häufiger p16^{INK4A}-positive Karzinome auf. Im Gegensatz dazu wurden bei Rauchern signifikant häufiger p53-positive Karzinome festgestellt. Des Weiteren waren p16^{INK4A}-positive TCa im Vergleich zu p16^{INK4A}-negativen TCa signifikant häufiger schlecht differenziert. Weitere signifikante Ergebnisse bezüglich einer Assoziation von klinisch-pathologische Parametern mit p16- bzw. p53-positiven TCa wurden nicht ermittelt.

In Bezug auf das Gesamtüberleben wies die Patientengruppe mit p16^{INK4A}-positiven Karzinomen einen signifikanten Vorteil im Vergleich zu der Patientengruppe mit p16^{INK4A}-negativen sowie der Patientengruppe mit p53-positiven Karzinomen auf.

Die vorliegende Studie kommt im Gegensatz zur Datenlage in der Literatur zu dem Schluss, dass eine eindeutige Abgrenzung von zwei unterschiedlichen Tumortypen bei TCa nicht möglich ist. Jedoch ließ sich in Bezug auf die Prognose ein eindeutiger Überlebensvorteil für Patienten mit p16^{INK4A}-positiven TCa nachweisen. Demzufolge ist der p53- und p16^{INK4A} -Antikörpernachweis ein geeignetes Verfahren, um prognostische Aussagen bezüglich des Gesamtüberlebens treffen zu können.

Darüber hinaus bestätigt diese Arbeit, dass der Nachweis für Antikörper gegen p16^{INK4A} ein exzellentes Mittel ist, um bei einem „Cancer of Unknown Primary“ (CUP-Syndrom) die Lokalisation des Primärtumors einzugrenzen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Mogoanta CA, Ion DA, Stanciu G, Ionita E, Bold A, Mateescu GA et al.: The importance of tumor proliferation markers in assessing lesions of the palatine tonsil. *Journal of Morphology & Embryology* 2011; 52, H. 3: 1033–1039.
2. Hafkamp HC, Speel EJM, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WNM, Ramaekers F, et al.: A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16^{INK4A} and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *International Journal of Cancer* 2003; 107, H. 3: 394–400.
3. Miller ME, Elashoff DA, Abemayor E, St. John M: Tonsillar squamous cell carcinoma: are we making a difference?. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2011; 145, H. 2: 236–241.
4. Ramquvist T, Dalians T: Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus. *Emerging Infectious Diseases Journal* 2010; 16, H. 11: 1671–1677.
5. Klussmann JP, Dinh S, Guntinas-Lichius O, Wittekindt C, Weißenborn S, Wieland U et al.: HPV-assoziierte Tonsillenkzinome. *HNO* 2004; 52, H. 3: 208–218.
6. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH: The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* 2010; 11, H. 1: 9–22.
7. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL: Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371: 1695–1709.
8. Galeone C, Edefonti V, Parpinel M, Leoncini E, Matsuo K, Talamini R et al.: Folate intake and the risk of oral cavity and pharyngeal cancer: a pooled analysis within the international head and neck cancer epidemiology consortium. *International Journal of Cancer* 2014; 00: 00-00; doi: 1002/ijc.29044.
9. Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RCK: Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Pathology* 2006; 59, H. 5: 445–453.
10. Krebs in Deutschland 2009/2010, 9. Ausgabe; Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2013, S. 24 ff.
11. Warnakulasuriya S: Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009; 45: 309–316.
12. Chung YL, Lee MY, Horng CF, Jian JJM, Cheng SH, Tsai SY, et al.: Use of combined molecular biomarkers for prediction of clinical outcomes in locally advanced tonsillar cancers treated with chemoradiotherapy alone. *Head & Neck* 2009; 31: 9–20.

13. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Research* 1988; 48: 3282–3287.
14. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E: Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncology* 1997; 33, H. 5: 302–312.
15. Chi AC, Day TA, Neville BW: Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma - an update. *A Cancer Journal for Clinicians* 2015; 65, H. 5: 401–421.
16. Gillison ML: Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head & Neck* 2007; 29, H. 8: 779–792.
17. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM et al.: Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *Journal of the National Cancer Institute* 1998; 90, H. 21: 1626–1636.
18. Duvvuri U, Myers JN: Contemporary management of oropharyngeal cancer. *Current Problems in Surgery* 2009; 46, H. 2: 119–184.
19. zur Hausen H: Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1288, H. 2: 55–78.
20. Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, Sztalmachova M, Adam V, Kizek R et al.: Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncology* 2014; 50, H. 3: 168–177.
21. Al-Swiahb JN, Huang CC, Fang FM, Chuang HC, Huang HY, Luo SD et al.: Prognostic impact of p16, p53, epidermal growth factor receptor, and human papillomavirus in oropharyngeal cancer in a betel nut-chewing area. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 2010; 136, H. 5: 502–508.
22. Boscolo-Rizzo P, Mistro AD, Bussu F, Lupato V, Baboci I, Aimadori G et al.: New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngologica Italica Journal* 2013; 33: 77–87.
23. Maier M, Kraft K, Steinestel K, Schramm A, Lorenz K J, Tisch M, et al.: Humane Papillomavirusinfektionen bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs. *HNO* 2013; 61, H. 7: 593–601.
24. Klussmann JP, Weissenborn S J, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfisteret HJ et al.: Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity?. *Medical Microbiology and Immunology* 2003; 192, H.3: 129–132.
25. Sengupta A: Recent advances in head and neck cancer. *Apollo Medicine* 2012; 9, H. 2: 96–103.

26. Riechelmann H: Humane Papillomaviren bei Kopf-Hals-Karzinomen. *Laryngo-Rhino-Otologie Journal* 2010; 89: 43–51.
27. Arora S, Aggarwal P, Pathak A, Bhandari R: Molecular genetics of head and neck cancer. *Molecular Medicine Reports* 2012; 6: 19–22.
28. Pai SI, Westra WH: Molecular pathology of head and neck cancer: Implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2009; 4, H. 1: 49–70.
29. Harries CC, Hollstein M: Clinical implications of the p53 Tumor-Suppressor gene. *The New England Journal of Medicine* 1993; 329, H. 18: 1318–1327.
30. Li W, Thompson CH, Cossart YE, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Rose BR: The expression of key cell cycle markers and presence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tonsil. *Head & Neck* 2004; 26, H. 1: 1-9.
31. Begum S, Ansari-Lari MA, Westra WH: Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clinical Cancer Research* 2003; 9: 6469–6475.
32. Genden EM, Ferlito A, Scully C, Shaha AR, Higgins K, Rinaldo A: Current management of tonsillar cancer. *Oral Oncology* 2003; 39, H. 4: 337–342.
33. Begum S, Cao D, Gillison M, et al.: Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2005; 11, H. 16: 5694–5699.
34. Panwar A, Batra R, Lydiatt WM, Ganti AK: Human papilloma virus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: a growing epidemic. *Cancer Treatment Reviews* 2014; 40, H. 2: 215–219.
35. Szentirmay Z, Polus K, Tamas L, Szentkuti G, Kurcsics J, Csernak E et al.: Human papillomavirus in head and neck cancer: molecular biology and clinicopathological correlations. *Cancer and Metastasis Reviews* 2005; 24: 19–34.
36. Braakhuis BJM, Snijders PJF, Keune WJH, Meijer CJLM, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH: Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *Journal of the National Cancer Institute* 2004; 96, H. 13: 998–1006.
37. zur Hausen H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 342–350.

38. Evans MF, Matthews A, Kandil D, Stewart-Crawford Adamson C, Trotman WE, Cooper K: Discrimination of "Driver" and "Passenger" HPV in tonsillar carcinomas by the polymerase chain reaction, chromogenic in situ hybridization, and p16^{INK4a} immunohistochemistry. *Head and Neck Pathology* 2011; 5, H. 4: 344–348.
39. Klussmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP et al.: Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *The American Journal of Pathology* 2003; 162, H. 3: 747–753.
40. Hoffmann M, Tribius S, Quabius ES, Henry H, Pfannenschmidt S, Burkhardt C et al.: HPV DNA, E6*I-mRNA expression and p16^{INK4A} immunohistochemistry in head and neck cancer – how valid is p16^{INK4A} as surrogate marker?. *Cancer Letters* 2012; 323, H. 1: 88–96.
41. Khleif SN, Degregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR et al.: Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93: 4350–4354.
42. Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM: The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *Journal of Dental Research* 2007; 86, H.2: 104–114.
43. Syrjänen S: HPV infections and tonsillar carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* 2004; 57, H. 5: 449–455.
44. Mashberg A, Samit A: Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *Cancer Journal for Clinicians* 1995; 45: 328–351.
45. Lell M, Hinkmann F, Gottwald F, Bautz W, Radkow T: Oropharynxpathologie. *Der Radiologe* 2009; 49, H. 1: 27–35.
46. Lingen MW, Kalmar JR, Karrison T, Speight PM: Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. *Oral Oncology* 2008; 44, H. 1: 10–22.
47. „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMW, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V., 2012; <https://www.awmf.org>.
48. van der Waal I: Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology* 2009; 45, H. 4: 317–323.

49. Geißler C, Tahtali A, Diensthuber M, Gassner D, Stöver T, Wagenblast J: The role of p16 expression as a predictive marker in HPV-positive oral SCCN - a retrospective single-center study. *Anticancer Research* 2013; 33, H.3: 913–916.
50. Hoffmann M, Ihloff AS, Gorogh T, Weiss JB, Fazel A, Krams M et al.: p16^{INK4a} overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *International Journal of Cancer* 2010; 127, H. 7:1595–1602.
51. Thompson LDR: Squamous cell carcinoma variants of the head and neck. *Current Diagnostic Pathology* 2003; 9, H. 6: 384–396.
52. Cardesa A, Nadal A: Carcinoma of the head and neck in the HPV era. *Acta Dermatovenerologica Alpina* 2011; 20, H. 3: 161–173.
53. Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D: World Health Organization Classification of Tumours. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors*. IARCPress: Lyon 2005, S. 163 ff.
54. Wittekind C, Meyer HJ: TNM: Klassifikation Maligner Tumoren, 7. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KG 2010, S. 23 ff.
55. Urban D, Corry J, Rischin D: What is the best treatment for patients with human papillomavirus-positive and -negative oropharyngeal cancer?. *Cancer* 2014; 120: 1462–1470.
56. Suh Y, Amelio I, Guerrero Urbano T, Tavassoli M: Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Head and neck cancer* 2014; 5: 1–12; doi:1038/cddis.2013.548.
57. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M: Virale Kanzerogenese von Kopf-Hals-Tumoren. *Der Pathologe* 2004; 25, H. 1: 21–30.
58. Matzinger O, Zouhair A, Mirimanoff RO, Ozsahin M: Radiochemotherapy in locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clinical Oncology* 2009; 21, H. 7: 525–531.
59. Majchrzak E, Szybiak B, Wegner A, Pienkowski P, Pazdrowski J, Luczewski L et al.: Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. *Radiology and Oncology* 2014; 48, H. 1: 1–10.
60. Cohan DM, Popat S, Kaplan SE, Rigual N, Loree T, Hicks WL: Oropharyngeal cancer: current understanding and management. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 2009; 17, H. 2: 88–94.
61. Zenner HP: *Praktische Therapie von HNO-Krankheiten*. 2. Auflage, Stuttgart; New York: Schattauer, 2008, S. 304 ff.

62. Woolgar JA, Triantafyllou A: Lymph node metastases in head and neck malignancies: assessment in practice and prognostic importance. *Diagnostic Histopathology* 2010; 16, H. 6: 265–275.
63. Enepekides DJ, Sultanem K, Nguyen C, Shenouda G, Rochon B et al.: Occult cervical metastases: immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 1999; 120, H.5: 713–717.
64. Reiß M: *Facharztwissen HNO-Heilkunde: Differenzierte Diagnostik und Therapie*. Springer, 2009, S. 512 ff.
65. Kononen J, Bubendorf L, Anne Kallionimeni A, Bärhund M, Schraml P, Leighton S et al.: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine* 1998; 4, H. 7: 844–847.
66. Giltane JM, Rimm DL: Technology Insight: identification of biomarkers with tissue microarray technology. *Nature Clinical Practice Oncology* 2004; 1, H. 2: 104–111.
67. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G: Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *International Journal of Cancer* 2001; 94, H. 1: 1–5.
68. Cardiff RD, Miller CH, Munn RJ: Manual immunohistochemistry staining of mouse tissues using the Avidin-Biotin Complex (ABC) technique. *Cold Spring Harbor Protocols* 2014; 659-662; doi:1101/pdb.prot073429.
69. Wilcheck M, Bayer EA: The Avidin-Biotin Complex in bioanalytical applications. *Analytical Biochemistry* 1988; 171: 1-32.
70. Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1981; 29, H. 4: 577–580.
71. Tubbs RR, Sheibani K, Deodhar SD, Hawk WA: Enzyme immunohistochemistry: review of technical aspects and diagnostic applications. *Cleveland Clinic Quarterly* 1981; 48, H. 2: 245–282.
72. Oguejiofor KK, Hall JS, Mani N, Douglas C, Slevin NJ, Homer J, et al.: The prognostic significance of the biomarker p16 in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clinical Oncology* 2013; 25, H. 11: 630–638.
73. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Sasaki C, et al.: Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clin Cancer Research* 2004; 10: 5684–5691.

74. Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I, Green E, Tornillo L, Lugli A, et al.: p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Annals of Oncology* 2010; 21, H. 10: 1961–1966.
75. Smith EM, Rubenstein LM, Hoffman H, Haugen TH, Turek LP: Human papillomavirus, p16 and p53 expression associated with survival of head and neck cancer. *Infectious Agents and Cancer* 2010; 5: 4; doi:1186/1750-9378-5-4.
76. Kuo KT, Hsiao CH, Lin CH, Kuo LT, Huang SH, Lin MC: The biomarkers of human papillomavirus infection in tonsillar squamous cell carcinoma-molecular basis and predicting favorable outcome. *Modern Pathology* 2008; 21: 376–386.
77. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, Voogd AC, Schepers M, Bot FJ, et al.: Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *International Journal of Cancer* 2008; 122, H. 12: 2656–2664.
78. Friedland P, Thomas A, Naran A, Amanuel B, Grieu-lacopetta F, Carrello, et al.: Human papillomavirus and gene mutations in head and neck squamous carcinomas. *ANZ Journal of Surgery* 2012; 82, H. 5: 362–366.
79. Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Cossart YE, et al.: Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *International Journal of Cancer* 2003; 106, H. 4: 553–558.
80. Charfi L, Jouffroy T, Cremoux P, Le Peltier N, Thioux M, Fréneaux P et al.: Two types of squamous cell carcinoma of the palatine tonsil characterized by distinct etiology, molecular features and outcome. *Cancer Letters* 2008; 260: 72–78.
81. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA: The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral pathology* 2000; 29: 413–425.
82. Fallai C, Perrone F, Licitra L, Pilotti S, Locati L, Bossi P, et al.: Oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy or radiochemotherapy: prognostic role of TP53 and HPV status. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2009; 75, H. 4: 1053–1059.
83. Zengel P, Assmann G, Mollenhauer M, Jung A, Sotlar K, Kirchner T, et al.: Cancer of unknown primary originating from oropharyngeal carcinomas are strongly correlated to HPV positivity. *The New England Journal of Medicine* 2012; 461: 283–290.

84. O'Regan EM, Toner ME, Finn SP, Fan CY, Ring M, Hagmar B, et al.: p16^{INK4A} genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinomas. *Human Pathology* 2008; 39, H. 3: 452–458.
85. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML et al.: Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2003; 92, H. 9: 709–720.
86. Barten M, Ostwald C, Milde-Langosch K, Müller P, Wukasch Y, Löning T: HPV DNA and p53 alterations in oropharyngeal carcinomas. *Virchows Arch* 1995; 427: 153-157.
87. Snijders P, Steenbergen R, Top B, Scott S, Meijer C, Walboomers J: Analysis of p53 status in tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Journal of General Virology* 1994; 75, 2769-2775.
88. Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM: Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research* 2008; 14, H. 2: 366–369.
89. Delellis R, Sternberger L, Mann R, Banks P, Nakane P: Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. *Am J Clin Pathol* 1979; 71, H. 5: 483–1979488.
90. Riera JR: Automation in immunohistochemistry. *Rev Esp Pathology* 1999; 32, H. 3: 358-360.
91. Dabbs D: Diagnostic immunohistochemistry, 4. Auflage, Elsevier 2013, S.30 ff.
92. Kwok S HR: Avoiding false positives with PCR. *NATURE* 1989; 339: 237-238; doi:1038/339237a0.
93. Mülhardt C: Der Experimentator Molekularbiologie Genomics, 3. Auflage, Springer 2009, S. 66 ff.
94. Desai PC, Jaglal MV, Gopal P, Ghim SJ, Miller DM, Farghaly H, Jenson AB: Human papillomavirus in metastatic squamous carcinoma from unknown primaries in the head and neck: a retrospective 7 year study. *Experimental and Molecular Pathology* 2009; 87, H. 2: 94–98.
95. Kim TW, Choi SY, Ko YH, Baek CH, Son Y: The prognostic role of p16 expression in tonsil cancer treated by either surgery or radiation. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology* 2012; 5, H. 4: 207–212.
96. Li W, Tran N, Lee SC, O'Brien CJ, Tse GM, Scolyer RA, et al.: New evidence for geographic variation in the role of human papillomavirus in tonsillar carcinogenesis. *Pathology* 2007; 39, H. 2: 217–222.

97. Park K, Cho KJ, Lee M, Yoon DH, Kim J, Kim SY, et al.: p16 immunohistochemistry alone is a better prognosticator in tonsil cancer than human papillomavirus in situ hybridization with or without p16 immunohistochemistry. *Acta Otolaryngologica* 2013; 133, H. 3: 297–304.
98. Ryu CH, Ryu J, Cho KH, Moon SH, Yun T, Lee SH, et al.: Human papillomavirus-related cell cycle markers can predict survival outcomes following a transoral lateral oropharyngectomy for tonsillar squamous cell carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 2014; 110, H. 4: 393–399.
99. El-Mofty SK, Lu DW: Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients. *The American Journal of Surgical Pathology* 2003; 27, H. 11: 1463–1470.
100. Li W, Thompson CH, Xin D, Cossart YE, O'Brien CJ, McNeil EB, et al.: Absence of human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas from chinese patients. *The American Journal of Pathology* 2003; 163, H. 6: 2185–2189.
101. Wittekindt C, Gültekin E, Weissenborn SJ, Dienes HP, Pfister HJ, Klussmann JP: Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. *Advances in Otorhinolaryngology (Basel)* 2005; 62: 72–80.
102. Carpenter DH, El-Mofty SK, Lewis JS: Undifferentiated carcinoma of the oropharynx: a human papillomavirus-associated tumor with a favorable prognosis. *Modern Pathology* 2011; 24, H. 10: 1306–1312.
103. Chernock RD, El-Mofty SK, Thorstad WL, Parvin CA, Lewis JS: HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome. *Head and Neck Pathology* 2009; 3: 186–194.
104. Lewis JS, Thorstad WL, Chernock RD, Haughey B H, Yip JH, Zhang Q, El-Mofty SK: p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *The American Journal of Surgical Pathology* 2010; 34, H. 8: 1088–1096.
105. Melkane AE, Mirghani H, Aupérin A, Saulnier P, Lacroix L, Vielh P, et al.: HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinomas: a comparison between three diagnostic approaches. *American Journal of Otolaryngology* 2014; 35, H.1: 25–32.
106. Mooren JJ, Gültekin SE, Straetmans J, Haesevoets A, Peutz-Kootstra CJ, Huebbers CU, et al.: P16^{INK4A} immunostaining is a strong indicator for high-risk-HPV-associated oropharyngeal carcinomas and dysplasias, but is unreliable to predict low-risk-HPV-infection in head and neck papillomas and laryngeal dysplasias. *International Journal of Cancer* 2014; 134, H. 9: 2108–2117.

107. Broglie MA, Soltermann A, Rohrbach D, Haile SR, Pawlita M, Studer G, Huber GF, Moch H, Stoeckli SJ: Impact of p16, p53, smoking, and alcohol on survival in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with primary intensity-modulated chemoradiation. *Head & Neck* 2013; 35, H. 12: 1698–1706.
108. Fischer CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli , et al.: Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality?. *International Journal of Cancer* 2010; 126: 1256–1262.
109. Kumar RV, Kadkol SS, Daniel R, Shenoy AM, Shah KV: Human papillomavirus, p53 and Cyclin D1 expression in oropharyngeal carcinoma. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2003; 32: 539–543.
110. Chernock RD, Lewis JS, Zhang Q, El-Mofty SK: Human papillomavirus–positive basaloid squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract: a distinct clinicopathologic and molecular subtype of basaloid squamous cell carcinoma. *Human Pathology* 2010; 41, H. 7: 1016–1023.
111. Dahlstrand H, Näsman A, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Dalianis T: Human papillomavirus accounts both for increased incidence and better prognosis in tonsillar cancer. *Anticancer Research* 2008; 28, 1133–1138.
112. Dok R, Kalev P, Van Limbergen EJ, Asbagh LA, Vazquez I, Hauben E, et al.: p16^{INK4a} impairs homologous recombination-mediated DNA repair in human papillomavirus-positive head and neck tumors. *Cancer Research* 2014; 74, H. 6: 1739–1751.
113. Hoffmann M, Quabius E S, Tribius S, Hebebrand L, Gorogh T, Halec G et al.: Human papillomavirus infection in head and neck cancer: the role of the secretory leukocyte protease inhibitor. *Oncology reports* 2013; 29: 1962-1968,
114. Compton AM, Moore-Medlin T, Herman-Ferdinandez L, Clark C, Caldito GC, Wang XI, et al.: Human papillomavirus in metastatic lymph nodes from unknown primary head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 2011; 145, H. 1: 51–57.
115. Weiss D, Koopmann M, Rudack C: Prevalence and impact on clinicopathological characteristics of human papillomavirus-16 DNA in cervical lymph node metastases of head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 2011; 33, H. 6: 856–862.
116. Gillison ML, D’Souza G , Westra W , Sugar E , Xiao W: Papillomavirus type 16 – positive and human papillomavirus type 16 – negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2008; 100: 407–420.

117. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA: HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncology* 2010; 11: 781–789.
118. Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Márton JJ: Expression of p16^{INK4A}, p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006; 102, H. 3: 344–352.
119. Hafkamp HC, Mooren JJ, Claessen S, Klingenberg B, Voogd AC, Bot FJ, Klussmann JP et al.: P21Cip1/WAF1 expression is strongly associated with HPV-positive tonsillar carcinoma and a favorable prognosis. *Modern Pathology* 2009; 22, H. 5: 686–698.
120. Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Gravitt PE, Shah KV, Gillison ML: Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189: 686–698.
121. Ramqvist T, Dalians T: An epidemic of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) due to human papillomavirus (HPV) infection and aspects of treatment and prevention. *Anticancer Research* 2011; 31, 1515–1520.
122. Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, Bladström A, Hansson BG, A, Andersson G: Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngologica* 2005; 125, H. 12: 1327–1336.
123. Gillison ML, Zhang Q, Jordan R, Xiao W, Westra WH, Trotti A, et al.: Tobacco smoking and increased risk of death and progression for patients with p16-positive and p16-negative oropharyngeal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2012; 30, H. 17: 2102–2111.
124. Langendijk JA, Psyrri A: The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and future clinical studies. *Annals of Oncology* 2010; 21, H. 10: 1931–1934.
125. Hong AM, Martin A, Chatfield M, Jones D, Zhang M, Armstrong B, et al.: Human papillomavirus, smoking status and outcomes in tonsillar squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 2013; 132, H. 12: 2748–2754.
126. Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E: Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *International Journal of Cancer* 2000; 89: 300–304.

VII. DANKSAGUNG

Nachfolgend möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die Ermöglichung der wissenschaftlichen Forschung am Institut für Pathologie der Universität Rostock bedanken. Vielen Dank für die geduldige Betreuung und fachliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Einen weiteren besonderen Dank gilt es an Frau Dr. Zimpfer auszusprechen. Vielen Dank für den anregenden Gedankenaustausch und die hilfreiche Begleitung im Rahmen der Durchführung des praktischen Teils dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des pathologischen Instituts der Universität Rostock herzlichst bedanken. Außerdem möchte ich Herrn Dr. med. Ovarii des Instituts für HNO der Universität Rostock für die Bereitstellung der Nikotin- und Alkoholanamnese des Patientenkollektivs bedanken. Weiterhin möchte ich Frau Zettel, Mitarbeiterin des Tumordatenbank-Systems der Universität Rostock, für die Bereitstellung der klinischen Daten danken.

Außerdem großen Dank verpflichtet bin ich den Patienten, da ohne deren Zustimmung und Bereitstellung Ihrer persönlichen Daten und Gewebeproben diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Meinen innigsten Dank gilt meiner Mutter für die fortwährende und bedingungslose Unterstützung in allen Phasen meines Lebens.

VIII. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

IX. CURRICULUM VITAE

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Dissertation nicht veröffentlicht.